

Université de Sherbrooke

**Isolation des ADNc de l'antigène tumoral  
CA125 dans le cancer ovarien**

par

Mélanie Simoneau

Département de microbiologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine  
en vue de l'obtention du grade de  
maître ès sciences (M.S.)

6 juin 2003



National Library  
of Canada

Bibliothèque nationale  
du Canada

Acquisitions and  
Bibliographic Services

Acquisitions et  
services bibliographiques

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file    Votre référence*

*ISBN: 0-612-86691-2*

*Our file    Notre référence*

*ISBN: 0-612-86691-2*

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

**Canada**

## TABLE DES MATIÈRES

<b>LISTE DES ILLUSTRATIONS.....</b>	<b>VI</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS.....</b>	<b>VIII</b>
<b>RÉSUMÉ.....</b>	<b>IX</b>
<b>I. INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
1. Le cancer ovarien.....	1
1A) Généralité.....	1
2. Le cancer ovarien fait appel au processus métastatique .....	5
3. Les molécules impliquées dans le cancer ovarien.....	5
3A) Les gènes suppresseurs de tumeur et les oncogènes.....	8
3B) Les composantes de la matrice extracellulaire.....	10
3C) Les molécules d'adhésion cellulaire.....	12
3D) Les marqueurs tumoraux.....	14
4. Les mucines.....	17
4A) Structure.....	17
4B) Rôles.....	21
4C) Les mucines dans le cancer.....	22
5. CA 125.....	23
5A) Expression.....	24
5B) Fonctions.....	24
5C) Structure.....	25

6. Projet de maîtrise.....	26
<b>II. MATÉRIEL ET MÉTHODES.....</b>	<b>30</b>
1. Lignées cellulaires.....	30
2. Anticorps.....	31
2.1 Anticorps primaires.....	31
2.2 Anticorps secondaires.....	32
3. La détection de la protéine FLJ14303 et de CA 125 par immunobuvardage.....	32
3.1 Transfection.....	32
3.2 Immunobuvardage.....	33
4. Isolation des fragments d'ADNc inconnus de CA 125 par SMART <sup>TM</sup> RACE.....	35
4.1 Synthèse du premier brin d'ADNc.....	35
4.2 Amplification rapide des bouts d'ADNc (RACE).....	37
4.3 Clonage des produits de RACE.....	37
4.4 Criblage des colonies par hybridation (Grunstein and Hogness, 1975).....	38
5. Détection des transcrits de CA 125 et de la protéine hypothétique FLJ14303.....	39
5.1 Extraction des ARN totaux par trizol.....	39
5.2 Marquage des sondes au <sup>32</sup> P.....	40
5.3 Analyse Northern.....	41
6. Détection des ARNm traduits de la lignée NIH:OVCAR-3.....	42
6.1 Extraction de polysomes (polyribosomes).....	42
6.2 Extraction des ARNm.....	44



<b>III. RÉSULTATS</b> .....	46
1. Validation de la protéine hypothétique FLJ14303.....	46
2. Isolation des fragments d'ADNc de CA 125 par SMART <sup>TM</sup> RACE.....	49
3. Détection des transcrits de CA 125.....	60
4. Détection des ARNm traduits de CA 125.....	65
<b>IV. DISCUSSION</b> .....	70
1. Isolation des fragments d'ADNc de CA 125 par SMART <sup>TM</sup> RACE.....	72
2. Détection des transcrits de CA 125.....	78
3. Détection des ARNm traduits de CA 125.....	89
<b>V. CONCLUSION</b> .....	96
<b>REMERCIEMENTS</b> .....	98
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	99

## LISTE DES ILLUSTRATIONS

### FIGURES

1. Les différents stades du cancer ovarien.....	2
2. Structure de l’ovaire.....	4
3. Représentation des organes génitaux et du mésothélium de la plèvre, du péritoine et du péricarde.....	7
4. Molécules de la matrice extracellulaire et de l’adhésion cellulaire.....	11
5. Structure générale de la famille des mucines.....	19
6. Structure partielle de <i>MUC16</i> .....	27
7. Amplification de l’extrémité 5’ d’un ADNc spécifique par la technologie de SMART <sup>TM</sup> RACE.....	36
8. Extraction de polysomes par centrifugation sur un gradient de sucrose 20-45%..	45
9. Comparaison des séquences d’acides aminés des clones <i>MUC16</i> et FLJ14303...	48
10. Détection de la protéine hypothétique FLJ14303 par immunobuvardage.....	50
11. Amplification de l’extrémité 5’ manquante de <i>MUC16</i> à l’aide de la technologie de RACE.....	52
12. Amplification de l’extrémité 3’ de <i>MUC16</i> par RT-PCR.....	53
13. Amplification par RACE de différentes régions du récepteur de la transferrine.....	54
14. Alignement des séquences d’acides aminés des premiers produits de RACE avec celle de <i>MUC16</i> .....	57
15. Alignement des séquences de RACE 5’ avec <i>MUC16</i> .....	58
16. Amplification de l’extrémité 5’ manquante de <i>MUC16</i> par RACE.....	59

17. Détection des transcrits de CA 125 par l'analyse Northern.....	62
18. Détection du transcrit FLJ14303 par l'analyse Northern .....	64
19. Graphique représentant le profil des polysomes.....	67
20. Analyse Northern des ARNm traduits de CA 125.....	69
21. <i>Mapping</i> du gène <i>MUC16</i> sur l'ADN génomique humain.....	81
22. Alignement des clones FLJ14303, <i>MUC16</i> et CA 125 (O'Brien).....	82
23. Alignement des clones du premier RACE avec la séquence O'Brien proposée de CA 125.....	84
24. Profil des polysomes.....	91

## TABLEAUX

1. Fréquence des acides nucléiques A, C, G et T autour du codon d'initiation de la traduction chez les vertébrés.....	61
--	----

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire

ARNm: acide ribonucléique messenger

ARNr : acide ribonucléique ribosomal

BRCA: *Breast cancer*

BSA: albumine de sérum bovin (*bovine serum albumin*)

CA125: *cancer antigen*

CAE: *carcinomembryonic antigen*

DMEM: milieu d'Eagle modifié de Dulbecco (*Dulbecco Modified Eagles's medium*)

ECL: *Enhanced chemiluminescence*

EGF: facteur de croissance épidermique (*epidermal growth factor*)

FBS: sérum de bovin fœtal (*fetal bovin serum*)

HRP: *horseradish peroxidase*

KDa: kilodalton

MEC: matrice extracellulaire

MMP: métalloprotéase

MOPS: acide sulfonique 3-[N-morpholino] propane

MUC: gène d'une mucine

OVN-T: tissu ovarien

PBS: tampon phosphate saline

PCR : réaction d'amplification

PST: riche en prolines, sérines et thréonines

RACE: Rapid Amplification of cDNA Ends

RNase: ribonucléase

RT : transcriptase inverse

SEA: sea-urchin-sperm-protein-enterokinase-agrin

SSC: sel citrate de sodium

TR: répété en tandem

UPM: Universal Primer Mix

VNTR: nombre variable de répétitions en tandem

VWF: von-Willebrand factor

## RÉSUMÉ

### Isolation des ADNc de l'antigène tumoral CA125 dans le cancer ovarien

Mélanie Simoneau

Département de microbiologie, Faculté de médecine, Université de Sherbrooke

Le cancer ovarien est la cinquième cause de décès par cancer au Canada. Le cancer ovarien est la plupart du temps diagnostiqué tard. Le taux de survie aux stades tardifs est seulement de 20% ce qui fait de cette maladie le cancer gynécologique le plus mortel. La glycoprotéine CA125 est l'antigène tumoral le plus utilisé et le plus connu pour suivre la progression du cancer ovarien. Nous voulons déterminer son implication dans le cancer ovarien. Le clonage des ADNc (ADN complémentaire) de CA 125 serait un bon outil pour déterminer son rôle. En 2001, Yin et Lloyd ont cloné un ADNc de 5,9kb incomplet en 5'. Ce clone représente un bon candidat pour CA 125. Il a été nommé *MUC16* par le comité de nomenclature du séquençage du génome humain. Nous avons utilisé la technologie de RACE (amplification rapide des extrémités d'un ADNc), afin d'amplifier l'extrémité 5' manquante de l'ADNc de *MUC16*. Le RACE 5' a généré différents fragments d'ADN (2kb-3kb) qui sont similaires ou identiques aux répétitions du domaine PTS (riche en prolines, sérines et thréonines) de *MUC16*. Le clone *MUC16* possède 9 répétitions en tandem au niveau du domaine PTS. Les répétitions du clone *MUC16* sont très similaires, mais distinctes. L'alignement des produits de RACE 5' avec la séquence du clone de *MUC16* indique que certains produits de RACE 5' correspondent à des répétitions connues de *MUC16*, tandis que d'autres produits de RACE 5' seraient des répétitions différentes de celle connues de *MUC16*. Les séquences inconnues obtenues du RACE 5' pourraient correspondre à l'extrémité 5' manquante de *MUC16*. Ensuite, nous avons déterminé la taille approximative de l'extrémité 5' manquante du clone *MUC16*. Pour ce faire, nous avons analysé les transcrits de CA 125 par l'analyse Northern dans différentes lignées cellulaires de cancer ovarien (NIH:OVCA-3, SKOV-3ip1, SKOV-3, OV-4 et PA-1), dans les cellules primaires d'ovaire normal (OVN-T) ainsi que dans les lignées COS-7 et HeLa. Cette analyse révèle plusieurs transcrits dans chaque type cellulaire. Il y a au moins 8 transcrits spécifiques à CA125 entre 1kb et environ 35kb. Le nombre et l'intensité des transcrits varient selon le type cellulaire. Nous avons observé, tout particulièrement, que les transcrits >12kb sont peu ou pas présents dans les cellules primaires d'ovaire (OVN-T) contrairement aux lignées cellulaires de carcinome ovarien (NIH:OVCA-3, SKOV-3ip1 et SKOV-3). Finalement, nous avons effectué une extraction de polysomes dans la lignée NIH:OVCA-3, afin de d'identifier les transcrits traduits de CA125. Nous n'avons pas observé de transcrit traduit de CA 125 par l'analyse Northern dans les conditions utilisées.

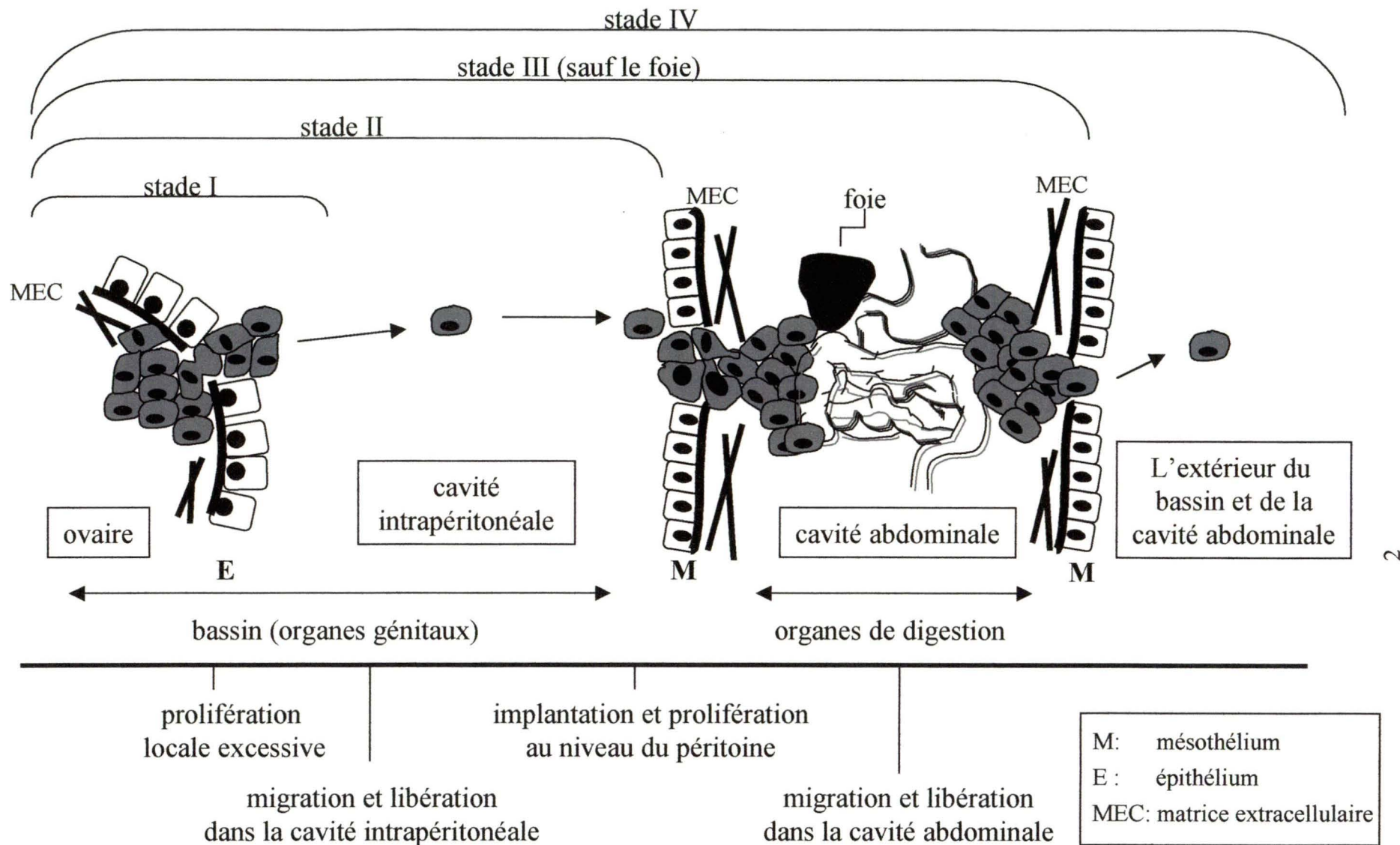
# **I. Introduction**

## ***1. Le cancer ovarien***

### ***A) Généralité***

Le cancer ovarien est la cinquième cause de décès par cancer au Canada et la quatrième au Royaume-Uni. Au Canada, 1 500 femmes meurent chaque année de ce cancer en comparaison à 4 000 au Royaume-Uni (Menon et Jacobs, 2002; McLaughlin et al., 2002). Il affecte principalement les femmes âgées entre 50 et 75 ans. Du point de vue clinique, le cancer ovarien est classifié en quatre stades. Le premier se caractérise par une tumeur limitée à l'ovaire alors que le second correspond à une extension tumorale qui s'étend jusqu'au bassin. Le stade III réfère au cancer qui s'est propagé au-delà de l'ovaire, mais dont l'étendue se limite au bassin et à la cavité abdominale (excluant le foie). Finalement, le stade IV représente la propagation du cancer à l'extérieur de l'ovaire et de l'abdomen (ou au foie) (McLaughlin et al., 2002)(figure 1).

Le faible taux de survie des patientes atteintes d'un cancer ovarien est relié au diagnostique tardif de la maladie. En effet, le cancer ovarien n'est généralement pas diagnostiqué avant les stades III et IV, car les symptômes sont non spécifiques. Le taux de survie aux stades tardifs est seulement de 20%, ce qui fait de cette maladie le cancer gynécologique le plus mortel. Si le cancer ovarien était diagnostiqué plus tôt (au stade I



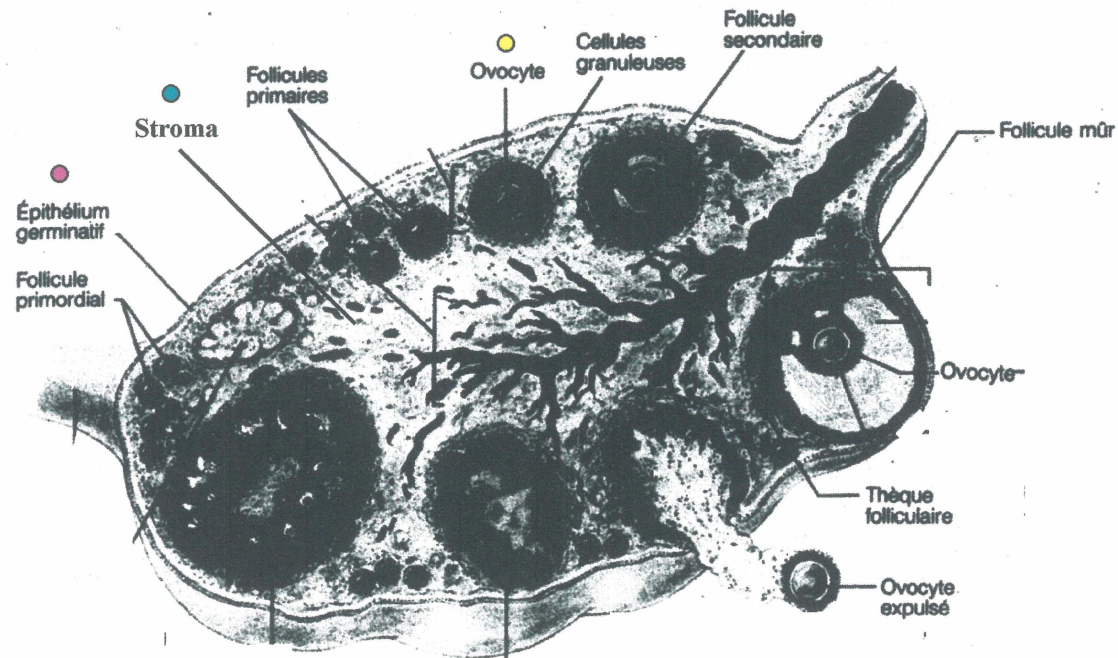
**Figure 1: Les différents stades du cancer ovarien.** Le cancer ovarien débute au niveau de l'ovaire (stade I), ensuite il se propage dans le bassin (stade II), ensuite dans l'abdomen en excluant le foie (stade III) et finalement dans le foie ou à l'extérieur de l'abdomen (stade IV). La progression du cancer ovarien fait appel au processus métastatique. Les molécules de la matrice extracellulaire (MEC) et de l'adhésion cellulaire se retrouvent impliquées dans ce processus métastatique.



ou II), soit avant le processus métastatique, plus de 80% des femmes traitées seraient encore vivantes après cinq ans (McLaughlin et al., 2002).

Le traitement du cancer ovarien repose sur la combinaison de la chirurgie et de la chimiothérapie. La chirurgie permet d'enlever le maximum de la tumeur, tandis que la chimiothérapie tente de détruire les cellules cancéreuses non décelées et non extirpées. Le traitement de première ligne du cancer ovarien (la chimiothérapie) fait appel à l'association de deux médicaments, soit le paclitaxel et le cisplatine. Ce traitement de première ligne est très efficace, sauf que 80% des patientes font une rechute. Suit à cette récurrence, le cancer ovarien devient incurable (Hoskin et al., 2000).

Il existe plusieurs types de cancer ovarien. La diversité de ce cancer provient du fait qu'il se développe à partir de différents types cellulaires au niveau de l'ovaire. Ces différents types de cancer se distinguent par le type cellulaire à l'origine de la tumeur. Premièrement, il y a les tumeurs naissant du stroma. Le stroma est le tissu qui enveloppe l'ensemble des follicules ovariens. On trouve également les tumeurs germinales qui originent des cellules des ovocytes. Finalement, il y a les tumeurs épithéliales qui tirent leur origine des cellules de la surface de l'ovaire (figure 2). Le cancer ovarien de type épithélial est le plus fréquent et le plus mortel; il représente plus de 85% des cancers ovariens (McLaughlin et al., 2002).



4

**Figure 2: Structure de l'ovaire.** Le cancer ovarien débute soit au niveau des cellules de l'épithélium (●), des cellules à l'origine de l'ovocyte (●), ou des cellules constituant le stroma (tissu qui enveloppe l'ensemble des follicules, ●). Figure adaptée de Marieb, 1993.

## ***2. Le cancer ovarien fait appel au processus métastatique***

La plupart du temps, le cancer ovarien se forme au détriment de l'épithélium ovarien. Les tumeurs épithéliales sont généralement malignes et deviennent rapidement métastatiques rendant ainsi difficile la détection du cancer ovarien aux stades précoces de la maladie (Cruet et al.,1999). La transformation maligne de l'épithélium débute par la prolifération locale excessive de certaines cellules, puis de leur migration et de leur libération dans la cavité intrapéritonéale. Ces cellules peuvent ensuite s'implanter et proliférer au niveau du péritoine, ce qui provoque habituellement une réaction inflammatoire avec la production de liquide d'ascite, un fluide où baignent les cellules tumorales ovariennes regroupées en amas. C'est souvent à ce niveau que le cancer est diagnostiqué, dû à l'apparition de symptômes spécifiques à la maladie (Cruet et al.,1999).

Le processus métastatique du cancer ovarien diffère de celui des autres cancers épithéliaux, car les cellules tumorales restent généralement au niveau de l'abdomen au lieu d'emprunter le système vasculaire et lymphatique, créant ainsi un engorgement cellulaire autour des organes (figure 1). L'observation peu fréquente des cellules tumorales ovariennes à l'extérieur de l'abdomen est associée au blocage du système lymphatique (Feldman et Knapp, 1974; Gardner et al., 1995).

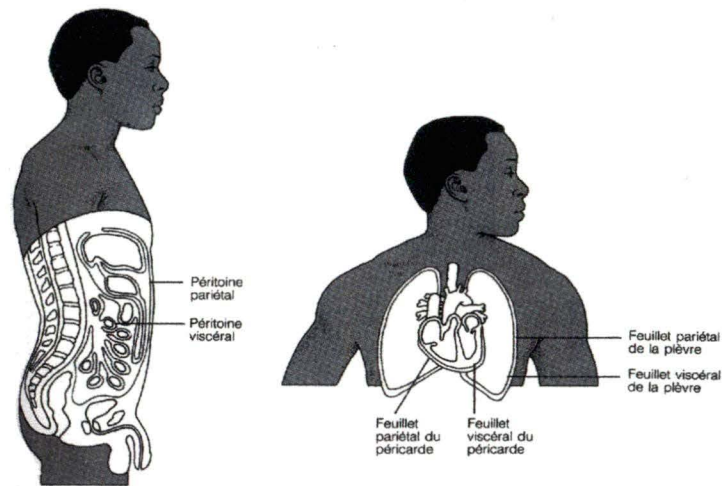
## ***3. Les molécules impliquées dans le cancer ovarien***

L'épithélium est composé d'une monocouche de cellules cubiques qui recouvre l'ovaire. Il est en continuité avec le mésothélium du péritoine, une membrane séreuse qui

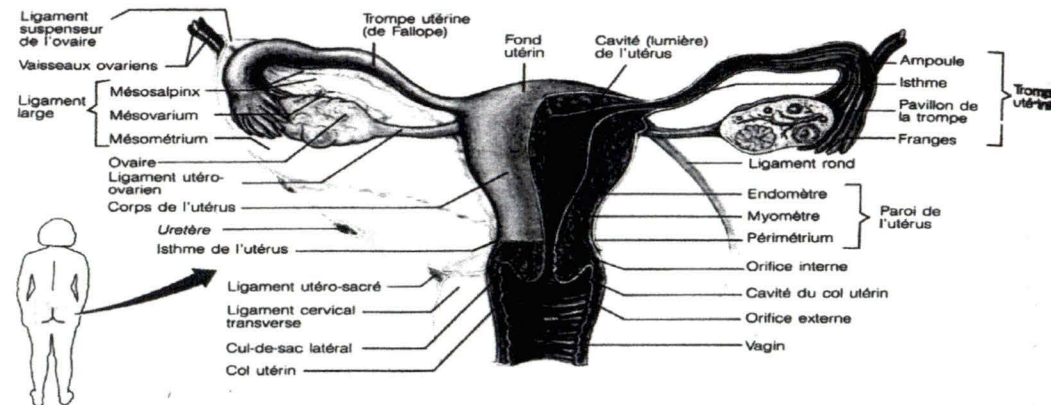
tapisse l'intérieur de la cavité abdominale et recouvre la surface des organes abdominaux (figure 3). À chaque cycle d'ovulation, l'épithélium subit des changements morphologiques et fonctionnels comme la prolifération intense, la migration, la dégradation et la reconstitution de la matrice extracellulaire. Ces changements ont pour objectif de réparer les blessures causées par l'ovulation. Ces propriétés rendent l'épithélium de l'ovaire particulièrement susceptible à la transformation maligne (Cruet et al., 1999).

Le risque de développer un cancer ovarien augmente avec le nombre croissant d'ovulations. L'effet de carcinogenèse semble être relié à la reconstitution de l'ovaire après chaque ovulation, plus précisément lors du processus de prolifération. Localement, les facteurs de croissances et les cytokines influencent la croissance et la différenciation cellulaire de l'épithélium de surface et peuvent conduire à des événements entraînant les changements néoplasiques (Bartlett, 2000). Le cancer ovarien de type épithélial semble survenir plus fréquemment au niveau des kystes d'inclusions germinaux. Ces kystes dérivent des fissures irrégulières de l'épithélium de surface, après la maturation et la formation des gamètes (Cruet et al., 1999).

Le cancer ovarien, comme les autres cancers, survient suite à une série d'aberrations au niveau de l'ADN. Les gènes suppresseurs de tumeurs, les oncogènes, les composantes de la matrice extracellulaire, les molécules d'adhésion et les marqueurs tumoraux sont des gènes connus pour être importants dans la pathogenèse de ce cancer (Cruet et al., 1999; Tong et al., 1999).



a) mésothélium du péricarde, du péritoine et de la plèvre



b) organes génitaux de la femme

**Figure 3: Représentation des organes génitaux et du mésothélium de la plèvre, du péricarde, du péritoine et du péricarde.** Chez l'adulte, CA 125 est exprimé au niveau des cellules mésothéliales de la plèvre, du péricarde, du péritoine et également dans plusieurs tissus gynécologiques, tel que l'endomètre et le col utérin. Tiré de Marieb, 1993.

### ***A) Les gènes suppresseurs de tumeur et les oncogènes***

Certaines régions chromosomiques sont connues pour être altérées dans le cancer ovarien. Parmi ces régions chromosomiques, on retrouve quelques oncogènes et gènes suppresseurs de tumeur (Tong et Kieback, 1999). La perte ou l'inactivation des deux copies des gènes suppresseurs de tumeur enlève les contraintes normales de la prolifération cellulaire. Certains gènes suppresseurs de tumeur sont souvent altérés dans le cancer ovarien. Par exemple, le gène p53 (phosphoprotéine nucléaire) situé sur le chromosome 17p est altéré dans 40-60% des cancers ovariens. Cette altération entraîne la production d'une protéine p53 mutante qui a la capacité de former un complexe avec la protéine sauvage et ainsi de l'inactiver par sa séquestration. La protéine p53 mutée est résistante à la dégradation cellulaire, ce qui favorise son accumulation dans le noyau et par conséquent, sa surexpression. La surexpression de cette protéine mutée est observée dans 50-75% des cancers ovariens épithéliaux. Malheureusement, la mutation de p53 correspond à l'altération la plus commune des cancers humains (50-60% des cancers du poumon, colorectal, du foie et de l'œsophage et 20% des cancers du sein et de l'endomètre) (McLaughlin, 2002). Certains gènes suppresseurs de tumeur, spécifiques au cancer ovarien, ont aussi été identifiés, tels que les gènes BRCA1. Plus de 90% des cancers ovariens familiaux proviennent d'une mutation autosomale dominante dans les gènes suppresseurs de tumeur BRCA1 (Breast Cancer 1) 17q et BRCA2 (Breast Cancer 2) 13q. Toutefois, ces gènes suppresseurs de tumeur sont rarement mutés dans les cancers sporadiques. Les cancers sporadiques représentent 90% des cancers épithéliaux

(Merajver et al., 1995; Foster et al., 1996; Boente et al., 1996; Piver et al., 1996-97; Bartlett, 2000).

L'activation de certains oncogènes est également observée dans les cancers ovariens. Il suffit qu'un seul allèle des oncogènes soit altérée pour amener la transformation de la cellule. Parmi les oncogènes altérés dans le cancer ovarien, on retrouve les oncogènes EGF-R (epidermal growth factor receptor) et c-erb-B2 (protéine de surface homologue à EGF-R). Ceux-ci sont surexprimés dans 30% des cancers ovariens (Tong et al., 1999). De plus, la surexpression de la protéine c-myc, dû à l'amplification de son gène, est observée dans 20-50% des cancers ovariens. D'autres oncogènes sont parfois amplifiés lors du cancer ovarien, tel que akt2 (kinase), mais ils ne sont pas considérés importants dans la tumorigenèse (Tong et al., 1999).

Étant donné que la majorité des cancers ovariens sont sporadiques, l'étude des causes du cancer ovarien est complexe. La participation des suppresseurs de tumeur et des oncogènes dans le cancer ovarien sporadique semble faible. Plusieurs autres protéines spécifiques se retrouvent également altérées dans le cancer ovarien. Ces protéines sont impliquées dans différentes voies cellulaires, tel que la dégradation de la matrice extracellulaire et l'altération des molécules d'adhésion.

## ***B) Les composantes de la matrice extracellulaire***

La matrice extracellulaire (MEC) est composée principalement de protéines fibrillaires (le collagène, la fibrilline, l'élastine, la fibronectine, ...) entourées de glycosaminoglycanes (GAGs). Les GAGs sont de longues chaînes polysaccharidiques non ramifiées composées d'unités disaccharidiques répétées. La MEC joue un rôle crucial dans l'organisation spatiale et la stabilité mécanique des tissus, et est produite par les cellules qui maintiennent l'architecture des tissus, c'est-à-dire les cellules de soutien (Janeway et Travers, 1996) (figure 4). Les composantes de la matrice extracellulaire sont fréquemment altérées dans les cancers ovariens de type épithélial (Carreiras et al., 1999). Par exemple, il a été suggéré que la vitronectine se retrouve altérée dans ce type de cancer ovarien. La vitronectine est une composante de la MEC qui permet l'adhésion cellulaire via l'intégrine  $\alpha_v$  (Carreiras et al., 1999).

L'épithélium de surface a la capacité de produire des composantes de la matrice extracellulaire (laminine, fibronectine, collagène IV, tenascine et vitronectine) et d'induire des changements dans sa composition. Elle produit aussi des enzymes protéolytiques, telles que les sérines protéases (uPA et tPA) et les métalloprotéases (MMP-2 et MMP-9). Le niveau d'expression des protéases est déterminé par la MEC et est inversement proportionnel à la croissance cellulaire (Bartlett, 2000; Cruet et al., 1999). Les tumeurs ovariennes possèdent un fort potentiel d'invasion grâce à la sécrétion d'enzymes qui dégradent la MEC. Cette dégradation est dépendante non seulement de la quantité





d'enzymes protéolytiques, mais aussi de la balance entre l'activité des protéases et de leurs inhibiteurs naturels. Il a été démontré que l'augmentation de l'activité des MMPs (métalloprotéases de la matrice) corrèle avec l'invasion et le potentiel métastatique dans une variété de cancer, dont le cancer ovarien. Ainsi, la dégradation de la MEC favorise l'invasion et l'apparition de métastases dans le cancer ovarien (Hoskins et al., 2000).

### ***C) Les molécules d'adhésion***

Lors d'un cancer ovarien de type épithélial, les cellules cancéreuses originant de l'épithélium se dissocient de l'ovaire et sont libérées dans la cavité intrapéritonéale. Ensuite, elles adhèrent aux cellules mésothéliales et à la MEC. Les cellules cancéreuses peuvent, par la suite, migrer à travers la couche de cellules mésothéliales et de la MEC. L'altération des systèmes impliqués dans l'adhésion cellulaire joue un rôle important dans le développement du cancer ovarien. Il existe au moins cinq familles de molécules d'adhésion: les protéoglycans (molécules caractérisées par la présence de GAGs), les intégrines (glycoprotéines transmembranaires composées de deux sous-unités,  $\alpha$  et  $\beta$ ), les cadhérines (glycoprotéines de surface), les sélectines (molécules de surface qui lient des composants saccharidiques sur des glycoprotéines spécifiques) et la superfamille d'immunoglobulines (molécule qui possède au moins un domaine immunoglobulinique) (figure 4). Certaines études suggèrent que quelques-unes de ces molécules d'adhésion

pourraient être impliquées dans le cancer ovarien. Par exemple, l'intégrine  $\alpha v \beta 3$  pourrait intervenir dans le contrôle de la prolifération de l'épithélium ovarien et dans la dissémination tumorale (Cruet et al., 1999). La famille des intégrines est connue pour participer aux interactions intercellulaires et à l'adhérence cellule-matrice extracellulaire. De plus, elle est impliquée dans la transmission de signaux régulateurs de la croissance, de la différenciation, de la migration et de la survie cellulaire. Des modifications dans l'expression et/ou la localisation des intégrines et de leurs ligands entraînent des changements pouvant être associés aux capacités de la tumeur à la prolifération, à la migration et à l'invasion (Cruet et al., 1999).

La famille des protéoglycans semble aussi importante dans la pathogenèse du cancer ovarien. Un des protéoglycans le plus étudié dans le cancer ovarien de type épithélial est CD44. Ce protéoglycan assure l'interaction intercellulaire via la liaison de son domaine extracellulaire avec l'acide hyaluronique (HA) et est relié aux fibres d'actines du cytosquelette. Il existe 10 variants de CD44 (v1-v10), ceux-ci proviennent de l'épissage alternatif et de la glycosylation différentielle. L'expression des variants CD44-v6 et CD44-v9 semble caractéristique des cancers ovariens épithéliaux. Par exemple, une augmentation du variant CD44-v6 corrèle avec l'augmentation de l'indice de la prolifération de la tumeur ovarienne. De plus, il a été proposé que l'interaction entre le HA mésothélial et le CD44 des cellules tumorales ovariennes pourrait être impliquée dans l'implantation intrapéritonéale de la tumeur, car le blocage in vivo de CD44 inhibe l'implantation des tumeurs ovariennes (Cruet et al., 1999).

L'altération des membres de la famille des cadhérines ne fait pas exception dans le cancer ovarien. Les cadhérines sont liées au cytosquelette d'actine via les caténines et sont le constituant majeur des jonctions d'adhérence et des desmosomes. Elles participent à la coordination de la morphogenèse, de la prolifération et de l'expression génique. La E-cadhérine, un membre de la famille des cadhérines, est retrouvée absente dans l'épithélium ovarien de surface normal, mais induite lors de tumeurs bénignes suggérant un rôle précoce de cette protéine dans la progression vers le phénotype malin (Cruet et al., 1999).

#### ***D) Les marqueurs tumoraux***

Les marqueurs tumoraux sont d'autres molécules impliquées dans le cancer ovarien. Ils sont produits par les cellules cancéreuses. On les retrouve dans la tumeur et ensuite, soit dans le sérum, l'urine, ou le liquide d'effusion des patients atteints de maladies néoplasiques. Selon la spécificité et la sensibilité des marqueurs tumoraux, ils peuvent être utilisés pour le dépistage, le diagnostique, le pronostique ou pour le suivi de l'évolution de la maladie et de la surveillance de l'efficacité du traitement.

Les marqueurs tumoraux incluent les antigènes onco-fœtaux ( $\alpha$ -foetoprotéine...), les antigènes sérologiques (CA 19.9, CA 50, CA 72,...), les antigènes placentaires (hormone chorionique gonatotrope HCG, hormone placentaire lactogène HPL, phosphatase

alcaline,...), les hormones peptidiques (hormone parathyroïdienne...), les hormones et précurseurs non peptidiques (catécholamines, mélanine,...), les enzymes (phosphatases alcalines, phosphatases acides, gamma-glutamyltransférase,...), les dérivés d'acides aminés et les protéines (sérotonine, caséine, ferritine,...) et les amines (spermidine, spermine, ...). Ces molécules sont toutes des constituants normaux de l'organisme. Toutefois, il existe plusieurs variants tumoraux qui présentent des modifications au niveau des chaînes glucidiques des glycoprotéines ou des mutations ponctuelles d'un ou plusieurs acides aminés. Ainsi, la structure des marqueurs tumoraux pourraient être différente entre un individu sain et un individu atteint d'un cancer (Touitou et Bogdan, 1988). La mucine MUC1 en est un très bon exemple. Cette protéine se retrouve surexprimée et montre une aberration au niveau de sa glycosylation dans plusieurs carcinomes (cancers associés aux cellules épithéliales) (Taylor-Papadimitriou, 1999). La protéine MUC1 est connue pour être antigéniquement distincte dans le cancer du sein. De cette façon, elle est utilisée comme marqueur pour prédire la rechute de ce cancer (Rye et McGuckin 2001; Taylor Papadimitriou, 1999).

La découverte de marqueurs tumoraux précoces dans le cancer ovarien occupe une place de choix. La détection de ces marqueurs tumoraux permettrait d'augmenter considérablement le taux de survie des patientes atteintes de cancer ovarien. Plus de 80% des femmes diagnostiquées tôt (aux stades I ou II), c'est à dire avant le processus métastatique, seraient encore en vie après cinq ans. Les marqueurs tumoraux connus ne sont toutefois pas des marqueurs précoces.

Les kallikréines hK6 et hK10 sont des marqueurs sérologiques potentiels pour le carcinome ovarien (Yousef et al., 2001) et CEA (*carcinoembryonic antigen*) est un marqueur tumoral sérologique élevé dans 25-50% des cancers ovariens (Hoskins et al., 2000). Malgré plusieurs études récentes, le meilleur marqueur tumoral dans le cancer ovarien reste l'antigène CA 125. Ce marqueur sérologique est le plus utilisé et le plus connu pour suivre la progression du cancer ovarien. Il est utilisé cliniquement depuis au moins 1988.

Le marqueur tumoral CA 125 est exprimé à un haut niveau ( $>35\text{U/ml}$ ) dans le sérum d'environ 85% des patientes de cancer ovarien de type épithélial. Ce haut niveau est presque exclusivement détecté lors des stades avancés de la maladie (Hoskins et al., 2000). Un haut niveau de CA 125 est également observé dans environ 22% des carcinomes du colon, 30% carcinomes de la trachée gastro-intestinale, 32% carcinomes du poumon et 58% des carcinomes du pancréas. Toutefois, il existe une bonne corrélation entre le niveau de CA 125 dans le sérum des patientes atteintes de cancer ovarien de type épithélial et la progression de la maladie ce qui n'est pas le cas pour les autres carcinomes. Le niveau de CA 125 dans le sérum est mesuré à l'aide de l'essai immunoradiométrique (IRMA) (McLaughlin, 2002). Certaines études récentes suggèrent fortement que la protéine CA 125 soit un membre de la famille des mucines (Yin et Lloyd, 2001).

## **4. Les mucines**

### **A) Structure**

Les gènes *MUC* encodent les apomucines qui sont l'axe peptidique des mucines (Porchet et al., 1999). Les mucines font partie d'une famille complexe de glycoprotéines à haut poids moléculaire et se caractérisent par une grande quantité de sites potentiels de O-glycosylation. Dans cette famille, la glycosylation compte pour plus de 50% de la masse moléculaire.

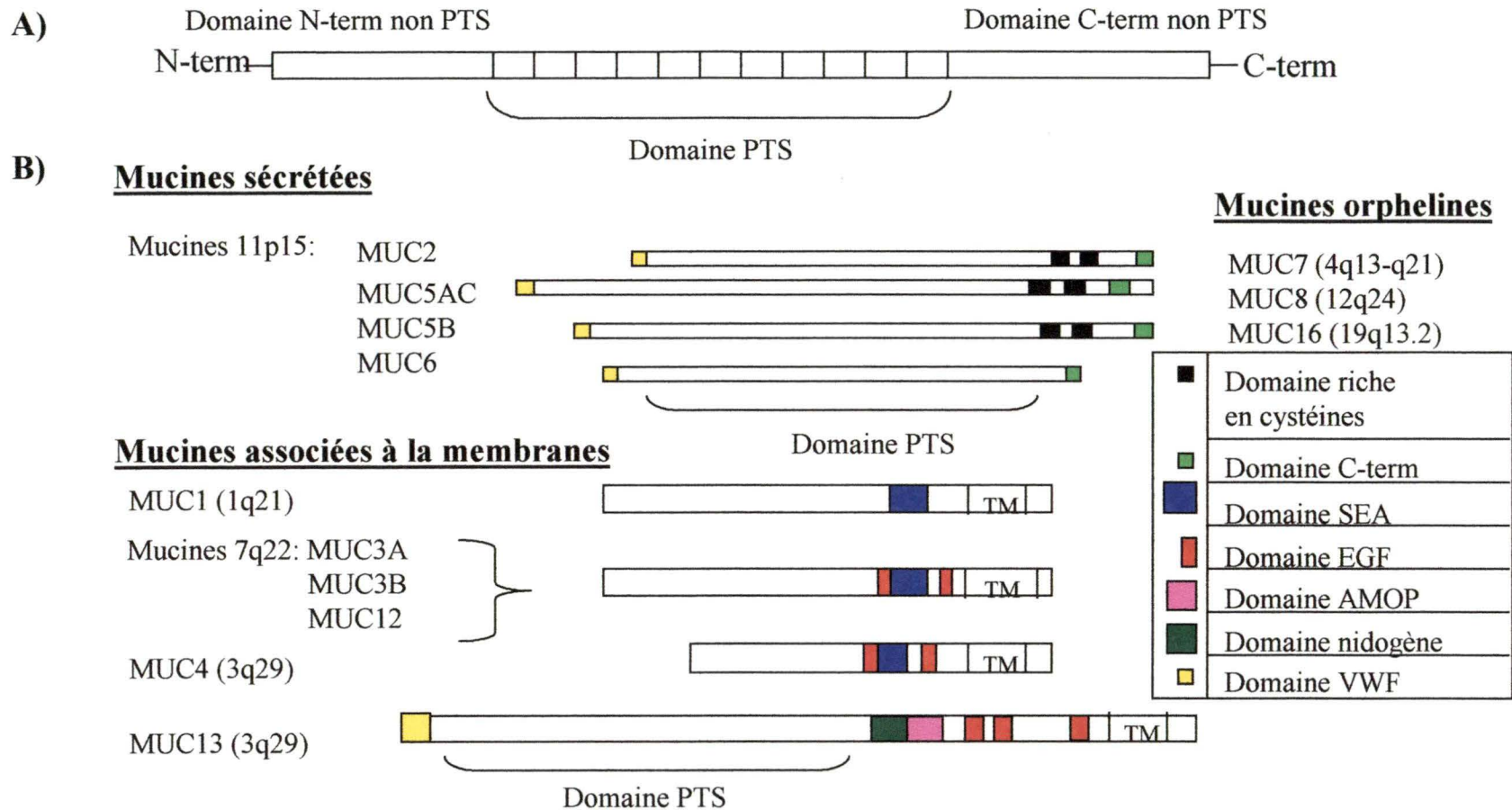
Les extrémités des gènes *MUC* sont composées de régions non répétées très conservées au cours de l'évolution (Porchet et al., 1999). La région centrale de ces gènes est composée de répétitions en tandem encodant plusieurs prolines, thréonines et sérines (domaine PTS). L'arrangement des prolines, thréonines et sérines dans le domaine PTS forme plusieurs sites de liaison pour des chaînes O-glycanniques. L'organisation génomique des gènes *MUC* indique que le domaine PTS serait encodé par un seul exon, quelque soit la taille de ce domaine. Au niveau des domaines PTS, on observe beaucoup de polymorphisme de type VNTR (nombre variable de répétitions en tandem) dû à l'instabilité du nombre de répétitions (Nollet et al., 1998; Dekker et al., 2002). De plus, plusieurs gènes *MUC* sont épissés de façon alternative. De cette façon, plusieurs mucines possèdent différents transcrits suite au polymorphisme et/ou à l'épissage alternatif (Porchet et al., 1999).

Les mucines humaines sont classées en deux principales catégories, soit les mucines sécrétées (constituants ou non du mucus) et les mucines associées à la membrane (Porchet et al, 1999). Il existe au moins 14 gènes encodant pour les mucines humaines : *MUC1*, 2, 3A et B, 4, 5AC et B, 6, 7, 8, 11, 12, 13 et 16. La séquence, le nombre et la longueur des répétitions diffèrent d'une mucine à l'autre (Dekker et al., 2002; Porchet et al., 1999). La comparaison des séquences polypeptidiques déduites permet de classer ces mucines en trois familles : les mucines 11p15, les mucines liées à la membrane et les mucines orphelines (Dekker et al, 2002) (figure 5).

La famille des mucines 11p15 (*MUC2*, *MUC5AC*, *MUC5B* et *MUC6*) se localise sur le chromosome 11p15 et a une homologie de 21-33% dans leur région non PTS. Ces mucines possèdent un domaine vWF (von-Willebrand factor) de type C et D et ont un domaine C-terminal conservé (Dekker et al., 2002). Les mucines *MUC2*, *MUC5AC* et *MUC5B* possèdent également un ou des domaines riches en cystéines dont la séquence est conservée et spécifique aux mucines. Les mucines 11p15 sont sécrétées et sont probablement responsables de la formation du mucus (Dekker et al, 2002) (figure 5).

Concernant les membres de la famille des mucines associées aux membranes, elles contiennent un domaine transmembranaire (TM) et sont apparentées entre elles. Dans cette famille on retrouve les mucines localisées au chromosome 7q22 (*MUC3A*, *MUC3B*, *MUC11* et *MUC12*), *MUC1*, *MUC4* et *MUC13*. Ces mucines sont très homologues, suggérant ainsi qu'elles pourraient originer d'un ancêtre commun. Elles possèdent, en plus du domaine TM, des domaines SEA (Sea-Urchin-Sperm-Protein-Enterokinase-





**Figure 5: Comparaison des séquences polypeptidiques des familles des mucines.** A) La structure générale des mucines comprend un domaine central PTS (riche en cystéines) et un domaine non PTS en N-terminal et en C-terminal. Le domaine PTS contient une séquence répétée en tandem. B) Les mucines sont divisées en trois familles. La famille des mucines 11p15 ont une homologie de 21-33% dans les régions non PTS. Ces mucines sont sécrétées et possèdent un domaine vWF (von-Willebrand factor) ainsi qu'un domaine C-terminal conservé. La majorité de ces mucines possèdent des domaines riches en cystéines. La famille des mucines associées à la membrane sont homologues en particulier par leurs domaines SEA (*sea-urchin-sperm-protein-enterokinase-agrin*), domaines EGF et domaine TM (transmembranaire). La famille des mucines orphelines comprend les mucines ayant une séquence unique. Figure adaptée de Dekker et al, 2002.

Agrin) et un ou deux domaines EGF-like. Le gène *MUC13* se situe sur le chromosome 3q29 et est homologue aux mucines situées sur le chromosomes 7q22, par leurs domaines TM, SEA et EGF-like. Le gène *MUC4* se situe également sur le chromosome 3q29. Elle est apparentée aux mucines 7q22, car elle possède un domaine TM et trois domaines EGF-like. Elle est aussi apparentée aux mucines 11p15, car elle possède un domaine vWF-D. Toutefois, elle se distingue des autres mucines par son domaine nidogène et son domaine AMOP (*adhesion-associated domain*) (Dekker et al., 2002). Le domaine nidogène est spécifique aux nidogènes (entactines), une composante de la matrice extracellulaire (Hohenester et Engel, 2002). Les mucines MUC1 (1q21) et MUC16 (19q13.2) contiennent un domaine TM et un ou des domaines SEA (Dekker et al., 2002) (figure 5).

La dernière famille des mucines est la famille des mucines orphelines. Les membres de cette famille (MUC7 et MUC8) n'ont aucune homologie avec les autres mucines (Dekker et al, 2002)(figure 5).

En résumé, les mucines sont constituées de juxtaposition de domaines fonctionnelles dont certains ont une forte similarités avec des domaines déjà connus (Porchet et al., 1999)

## ***B) Rôles***

Les mucines sont exprimées par les cellules épithéliales de certains organes. Sous les conditions physiologiques normales, les mucines sont connues pour jouer un rôle de protection des tissus épithéliaux. De plus, certaines évidences suggèrent que les mucines pourraient être impliquées dans le renouvellement et la différenciation de l'épithélium, et dans la modulation de l'adhésion et de la signalisation cellulaire (Andriafahanana et al., 2001). Par exemple, les travaux de modélisation réalisés à partir de prédictions informatiques concernant la mucine MUC5B montrent une superposition de sa structure avec celle de TGF $\beta$ . TGF $\beta$  est un facteur de croissance impliqué dans des fonctions biologiques très variées tel que le contrôle de la croissance, de la différenciation cellulaire et de la morphogenèse (Van Klinken et al., 1995).

Les mucines liées à la membrane ont une fonction d'interaction intercellulaire et d'adhérence avec la matrice extracellulaire. Concernant les mucines sécrétées, elles ont une fonction de protection. Elles protègent les cellules épithéliales de l'infection, de la déshydratation et des blessures physiques et chimiques (Van Klinken et al., 1995). Les mucines sécrétées sont le constituant majeur du mucus comme le mucus gastro-intestinal, respiratoire et de la trachée (Giuntoli et al., 1998). Le domaine vWF est nécessaire à l'assemblage des mucines sécrétées (Van Klinken et al., 1995).

### ***C) Les mucines dans le cancer***

En général, les mucines ont un patron d'expression spatio-temporel défini selon le développement de l'organisme. Des études récentes ont démontré une dérégulation au niveau de l'expression des mucines dans une variété de carcinomes (Andrianifahanana et al., 2001). Par exemple, la surexpression de la mucine MUC1 ainsi que l'aberration dans sa glycosylation joue un rôle dans la formation de métastases dans le cancer du sein. La protéine MUC1 mutée, inhibe l'adhésion de la tumeur et échappe à la surveillance du système immunitaire. (Van Klinken et al., 1995). Plus précisément, la surexpression de la protéine MUC1 mutée amène une diminution de l'adhésion intercellulaire et cellule-matrice, entraînant une inhibition des lymphocytes T et de l'adhésion de la tumeur. Ainsi, les fonctions de la mucine MUC1 favoriseraient la progression tumorale et la formation de métastases (Porchet et al., 1999)

La malignité des cellules épithéliales peut être associée à la glycosylation anormale des mucines (Andrianifahanana et al., 2001). Il a été démontré que l'altération de la glycosylation de certaines mucines est davantage observée chez les patientes atteintes d'un cancer ovarien que chez les personnes saines (Hanisch et al., 1988). De plus, l'expression des mucines diffère lors d'un cancer ovarien. Les mucines MUC1, 2, 3, 4, 5AC et 5B ont été observées dans l'ovaire cancéreux, tandis que dans l'ovaire sain, seulement les mucines MUC1 et MUC5AC ont été détectées. Les mucines MUC2, 3, 4 et 5B pourraient donc être impliquées dans la progression du cancer ovarien. En fait,

certaines données suggèrent un rôle entre l'expression des mucines et le processus métastatique lors du cancer ovarien (Giuntoli et al., 1998). Premièrement, l'altération des mucines peut diminuer l'habileté des néoplasmes à s'agréger et favoriser ainsi, la dissociation des cellules tumorales de leur site primitif. Ensuite, la liaison des mucines membranaires aux sélectines L et P peut jouer un rôle d'adhésion et de migration. Finalement, l'altération des mucines peut augmenter l'habileté des cellules à lier un site distal (Giuntoli et al., 1998) (figure 1). De cette façon les mucines pourraient jouer un rôle dans le processus métastatique lors d'un cancer ovarien.

## **5. CA 125**

CA 125 (cancer antigen) est une glycoprotéine de haut poids moléculaire qui fait probablement partie de la famille des mucines. Elle a été découverte en 1981 par Bast et Knapp à l'aide de l'anticorps monoclonal OC125 (IgG1). Cet anticorps a été obtenu d'un hybridome de cellules spléniques de souris immunisées avec la lignée humaine de cancer ovarien, OVCA 433 (Bast et al., 1981). L'anticorps OC125 reconnaît spécifiquement un déterminant antigénique présent dans les tumeurs épithéliales de l'ovaire ainsi que dans le sérum des patientes atteintes du cancer ovarien.

### ***A) Expression***

La protéine CA 125 est associée aux membranes plasmiques de certaines cellules et dans certains liquides de l'organisme. Elle est exprimée au niveau de l'épithélium coelomique et amniotique, lors du développement (Hoskins et al., 2000). Chez l'adulte, CA 125 est exprimée au niveau des structures dérivées de l'épithélium coelomique (les cellules mésothéliales de la plèvre, du péricarde et du péritoine). Elle se retrouve également exprimée dans plusieurs tissus gynécologiques, tels que l'endomètre et le col utérin (Figure 3). Finalement, CA 125 est exprimée dans le lait maternel, le liquide amniotique et le sérum. Dans le sérum, le niveau de CA 125 fluctue en fonction du stade physiologique. Par exemple, on observe une augmentation de CA 125 lors des menstruations. Normalement, le niveau de CA 125 ne dépasse pas 35U/ml. Dans certains carcinomes, le niveau de CA 125 peut cependant être plus élevé.

### ***B) Fonctions***

Les fonctions de CA 125 étaient, jusqu'à tout récemment, peu connues au manque d'informations biochimiques et génétiques. Ce manque d'information est relié au fait que la purification totale de la protéine CA 125 est complexe, que son gène a été partiellement cloné seulement en 2001 et que sa séquence génomique est incomplète (Yin et Lloyd,

2001). L'expression de CA 125 durant le développement fœtal et dans les tissus gynécologiques suggère un rôle dans le développement et la croissance cellulaire. De plus, CA 125 semble jouer un rôle dans le cancer ovarien puisque qu'elle n'est pratiquement pas détectée dans l'ovaire normal, mais qu'elle se retrouve fortement exprimée dans la majorité des cancers ovariens de type épithélial. Aussi, le niveau de CA 125 dans le sérum augmente en fonction de la progression du cancer.

#### ***D) Structure***

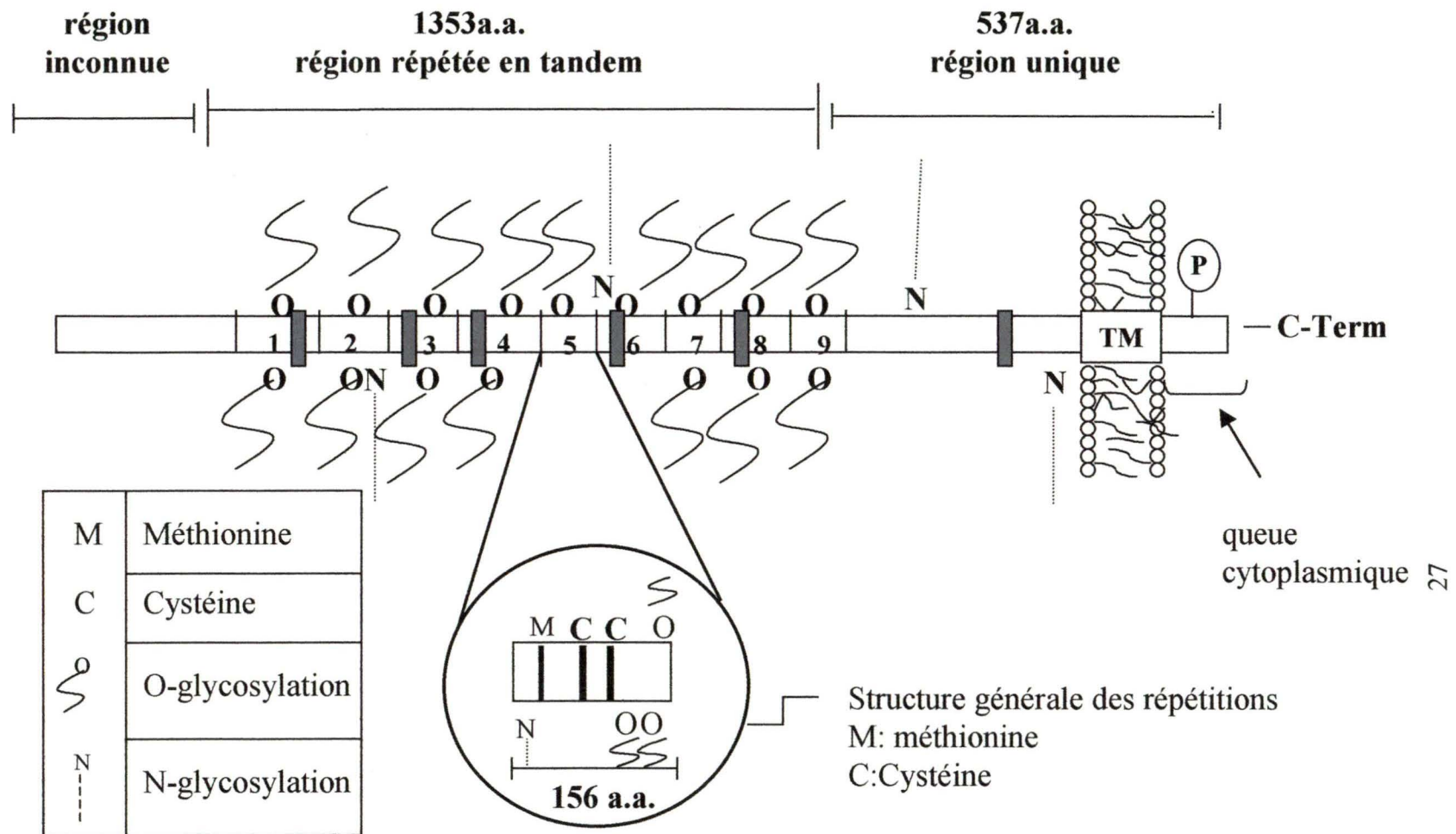
Le clonage partiel du gène de CA 125 (*MUC16*), en 2001, par Yin et Lloyd amène un avancement considérable des connaissances génétiques. Le gène partiel a été cloné en criblant une librairie humaine d'expression chez *E.coli* à l'aide d'un anticorps polyclonal de lapin. La librairie a été construite à partir des ARNm (ARN messenger) d'une lignée humaine de cancer ovarien, NIH : OVCAR-3. La séquence partielle obtenue du criblage de la librairie est de 5,9Kb. Elle comprend un codon stop et un site de polyadénylation (AATAAAA) en 3'. La séquence est incomplète en 5', car il n'y a pas de codon d'initiation de traduction dans le consensus de la boîte Kosak. La séquence d'acides aminés comprend, en N-terminal, une grande région de 9 répétitions en tandem (1353 acides aminés). Ces répétitions sont très similaires, mais non identiques. Elles sont riches en sérines, thréonines et prolines; des acides aminés qui forment des sites potentiels pour la liaison des chaînes O-glycanniques. Chaque répétition comprend une méthionine

et deux cystéines conservées. Le domaine C-terminal (573 acides aminés) comporte une région potentiellement transmembranaire et un site possible de phosphorylation de type tyrosine (Figure 6). De plus, la protéine MUC16 contient six domaines SEA. Ce clone partiel de CA 125 est homologue aux membres de la famille des mucines associées aux membranes par son domaine TM, ses domaines SEA et son domaine PTS. Toutefois, les autres régions de la séquence de la protéine MUC16 sont différentes des autres mucines. Ainsi, la structure de la protéine CA 125 semble très similaire aux membres de la famille des mucines et plus particulièrement, aux mucines associées aux membranes (Yin et Lloyd, 2001; Dekker et al., 2002).

## ***6. Projet de maîtrise***

La protéine CA 125 pourrait, par analogie avec les membres de la famille des mucines, jouer un rôle dans le cancer ovarien de type épithélial. Certaines évidences suggèrent qu'elle aurait une implication au niveau du processus métastatique via des fonctions dans l'adhésion intercellulaire et dans l'adhérence avec la matrice extracellulaire. Nous voulons donc déterminer l'implication de CA 125 dans ce type de cancer. Le projet de maîtrise visait à isoler l'ADN complémentaire (ADNc) complet de CA 125. Cet ADNc nous permettrait d'étudier le rôle de CA 125 dans le cancer ovarien. Avec cet outil de travail, nous pourrions, par exemple, faire des expériences de gain de fonction par addition de gène dans des lignées cellulaires et analyser son effet sur





**Figure 6: Structure partielle de CA125 suggérée par Yin et Lloyd en 2001 (clone MUC16).** Cette structure comprend 9 répétitions en tandem, un domaine transmembranaire (TM) et une queue cytoplasmique. Elle comprend également six domaines SEA (rectangle gris), cinq dans la région répétée en tandem et un dans la région unique. Finalement, elle possède un site potentiel de phosphorylation (P) au niveau de la queue cytoplasmique et plusieurs sites de glycosylations (N et O-glycosylation). Les sites de O-glycosylations sont particulièrement retrouvés dans la région répétée en tandem. Figure adaptée d'Obrien et al, 2001.

l'adhésion, sur la prolifération et la différenciation des cellules. De plus, nous pourrions étudier l'importance de chaque domaine de la protéine CA 125 en générant des mutations ponctuelles et de délétions.

Afin d'isoler l'ADNc complet de CA 125, différents travaux ont été réalisés. Premièrement, nous avons transfecté une portion de la séquence de CA 125 dans des cellules n'exprimant pas la protéine CA 125 et détecté la protéine recombinante avec deux anticorps spécifiques à CA 125 (OC125 et VK-8). La partie transfectée inclue trois répétitions en tandem, le domaine TM et la queue cytoplasmique de CA 125 (clone FLJ14303, 3.5kb en C-terminal de CA 125). Elle est reconnue par les deux anticorps spécifiques à CA 125 (OC125 et VK-8). L'information sur la séquence en 3' de CA 125 pourra être utilisée afin d'isoler l'ADNc complet de CA 125. Nous avons utilisé la technologie du RACE pour cloner les fragments de l'ADNc inconnus en 5' de CA 125. Ces fragments correspondent à des répétitions similaires et identiques à celles connues dans la région PTS de CA 125. Ensuite, nous avons déterminé la longueur et le nombre de transcrits de CA 125 par l'analyse Northern avec une sonde spécifique, soit la sonde FLJ14303 (3,5kb; C-terminal de CA 125). Plusieurs transcrits ont été observés, ceux-ci se situent entre 1 et environ 35 Kb. Finalement, nous avons tenté de déterminer les transcrits traduits de CA 125. Pour ce faire, nous avons extrait les polysomes de la lignée de carcinome ovarien NIH:OVCAR-3. Les ARNm des extraits de polysomes ont, ensuite, été isolés. Nous avons vérifié, par analyse Northern, l'efficacité de l'extraction des polysomes avec une sonde spécifique à la  $\beta$ -actine, un ARNm fortement traduit. Cette

technique nous a permis d'identifier la  $\beta$ -actine dans les fractions de polysomes. Nous avons, par la suite, voulu identifier les transcrits traduits de CA 125. Malheureusement, aucun transcrit traduit de CA 125 n'a été détecté par l'analyse Northern. L'isolation de ou des ADNc complets de CA 125 est complexe, dû à la présence de plusieurs transcrits dont certains sont très longs et à ses similarités structurales avec les mucines. Les gènes des mucines épithéliales sont réputés pour être difficiles à cloner à cause de leur long transcrit, de leur région PTS et de la présence de nombreuses O-glycosylations (Dekker et al., 2002; Van Klinken et al., 1995).

## II. Matériels et méthodes

### 1 Lignées cellulaires

**NIH:OVCAR-3 (Hamilton et al., 1984):** lignée humaine d'adénocarcinome ovarien provenant d'ascite. Cette lignée cellulaire a été obtenue de l'American Type Culture Collection, l'ATCC (Rockville, MD) et est cultivée dans un milieu RPMI-1640 (Bio Média; Drummondville, Canada) contenant 20%FBS (BioMédia, Drummondville, Canada), glutamine (30mg/ml BioMédia, Drummondville, Canada), l'insuline (10µg/ml Sigma; Missouri, USA), fungizone amphotéricine (2,5µg/ml) et des antibiotiques (penicilline sodium G 100U/ml et streptomycine sulfate 0,1µg/ml).

**COS-7:** lignée de fibroblaste de rein isolé du singe vert Africain (transformée par SV40). Elle provient de l'ATCC et est cultivée dans un milieu DMEM (BioMédia; Drummondville, Canada) contenant 10%FBS, du fungizone et des antibiotiques.

**SKOV3:** lignée humaine d'adénocarcinome ovarien provenant d'ascite. Elle a été obtenue de l'ATCC et est cultivée dans du milieu DMEM-F12 contenant 10%FBS, du fungizone et des antibiotiques.

**SKOV3ip1:** lignée de carcinome ovarien humain obtenue par Janet Price (MD Anderson Cancer Center Houston, TX). Cette lignée cellulaire est cultivée dans le milieu DMEM-F12 contenant 10%FBS, du fungizone et des antibiotiques.

**HeLa:** lignée épithéliale humaine isolée d'un carcinome du col utérin. Cette lignée provient de l'ATCC. Elle est cultivée dans le milieu DMEM-F12 10%FBS supplémenté

avec du fungizone et des antibiotiques.

**OV-4:** lignée humaine de carcinome ovarien (Timothy J. Ebertin). Elle est cultivée dans le milieu DMEM-F12 contenant 10%FBS, du fungizone et des antibiotiques.

**PA-1:** lignée humaine de tétatocarcinome ovarien provenant d'ascite. Cette lignée cellulaire a été obtenue de l'ATCC et est cultivée dans le milieu DMEM-F12 contenant 10%FBS, du fungizone et des antibiotiques.

**OVN-T (#22, 25, 44, 69, 75):** cellules primaires humaines d'ovaires normaux isolées en grattant un morceau de tissu d'ovaire (Banque FRSQ de tissus de cancer du sein, du cancer de l'ovaire, de l'ovaire et de cellules mésothéliales). Elles sont cultivées dans du milieu OSE (Medium 199/MCDB (50/50); Sigma, Missouri, USA) contenant 10%FBS, glutamine, fungizone et des antibiotiques.

Ces lignées cellulaires et cellules primaires sont cultivées à 37°C dans un incubateur humidifié avec 5% de CO<sub>2</sub>.

## **2 Anticorps**

### **2.1 Anticorps primaires**

Les anticorps monoclonaux OC125 (0,5mg/ml) et VK-8 (0,5mg/ml) ont été utilisés par immunobuvardage, afin de détecter CA 125. L'anticorps OC125 provenait de l'ascite de

souris (OC125 non purifié). Pour sa part, l'anticorps VK-8 a été obtenu d'hybridome de souris et purifié sur une colonne IgG (ImmunoPure IgG protein A purification, Pierce; Rocford, USA). Robert C. Bast, Jr (MD Anderson Cancer Center, Dallas, TX) nous a généreusement offert l'anticorps OC125 non purifié et Kenneth O. Lloyd, Ph.D. (Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, NY) nous a donné l'hybridome VK-8. La comparaison de la quantité de protéines par immunobuvardage a été réalisée à l'aide de l'anticorps  $\alpha$ -tubuline (clone B.5:1.2-), un anticorps provenant de l'ascite de souris (Sigma; Missouri, USA)

## 2.2 Anticorps secondaire

L'anticorps anti-souris est conjugué à la horseradish peroxidase (HRP), IgG de mouton (Jackson ImmunoResearch, Baltimore, USA)

## **3 La détection de la protéine hypothétique FLJ14303 et de CA 125 par immunobuvardage**

### 3.1 Transfection

La transfection du vecteur d'expression pME18S encodant FLJ14303 (Helix Research Institute, Japan) a été réalisée dans la lignée cellulaire COS-7 à l'aide du Fugen 6<sup>TM</sup> (Roche Molecular Biochemical, Laval, Canada) selon les recommandations du fabricant. Dans le vecteur pME18S/FLJ14303, l'expression de la protéine FLJ14303 est sous le

contrôle du promoteur SV40, un promoteur constitutif fort. La transfection a été effectuée en incubant pendant 1,5hres, 2µg de vecteur et 3µl de Fugen 6<sup>TM</sup> dans 100µl de milieu seul (DMEM F-12). Le mélange ADN a été incubé avec à la lignée COS-7 dans un incubateur à 37°C avec 5%CO<sub>2</sub> pendant 24-48hres, afin de permettre la transfection du vecteur et la production de la protéine FLJ14303. Au moment de la transfection, les cellules sont adhérees à un puit (plaque de six puits) contenant 2ml de milieu complet et sont confluentes à 40-50%. Afin de libérer les protéines cellulaires, chaque puit a été lavé deux fois avec 2ml de PBS 1X (PBS 10X: 91mM dibasic sodium phosphate, 17mM monobasic sodium phosphate, 150mM NaCl) et les cellules ont été grattées à l'aide d'un policeman. Ensuite, elles ont été soniquées (Branson Sonifier 250) environ deux fois 10 sec. dans un volume final de 200µl de PBS 1X contenant des inhibiteurs de protéases (AEBSF 1µg/ml, leupeptine 0,5µg/ml, aprotinine 2µg/ml et pepstatine A 6,7µg/ml ; Boehringer, Mannheim). Le sonicateur a été ajusté à 20 cycles avec une force de 1. Finalement, les protéines ont été dosées par la méthode de Bradford (BioRad, Hercules, USA) avec le protocole du fabricant.

### 3.2 Immunobuvardage

Les protéines (25µg) ont été chauffées 5min à 95°C dans un tampon de dénaturation 4X (0,2M Tris-HCl pH6,8, 4% SDS, 40% glycérol, 4% β-Mercaptoéthanol) dilué 1X et migrées à 20mA environ 1,5hres sur un gel SDS-PAGE dénaturant. Le gel SDS-Page était composé d'une partie supérieure de 4% (gel concentrateur: 4% acrylamide/Bis (BioRad),

25,2% tampon tris 1,5M pH6,8, 60% eau distillée, 0,1%SDS, 0,05%APS (ammonium persulfate) et 0,1% Temed) et d'une partie inférieure de 7,5% (gel séparateur: 7,5% acrylamide/Bis (Biorad), 50% tampon tris 1,5M pH8.8, 0,05%APS et 0,1%Temed). Les protéines migrées ont été, ensuite, transférées sur une membrane Hybond-P (Amersham Pharmacia Biotech; Baie d'Urfé, Canada) à 300mA pendant 2hres à 4°C à l'aide du système BioRad. Une fois les protéines transférées, la membrane a été bloquée avec une solution de PBS 1X-0,1% Tween 20 contenant 4% de lait en poudre (BioRad, Hercules, USA) pendant 1hre à température ambiante, avec agitation constante. Par la suite, la membrane a été incubée avec un anticorps primaire spécifique à la protéine d'intérêt pendant la nuit à 4°C. Les anticorps primaires (OC125 1:500, VK-8 1:500 et  $\alpha$ -Tubuline 1:10 000) ont été dilués dans la même solution que la solution de blocage. Après, la membrane a été lavée trois fois 15min à température ambiante dans la solution de PBS 1X-0,1% Tween 20, avec agitation constante. Ensuite, la membrane a été incubée avec l'anticorps secondaire conjugué à la HRP de souris pendant 45min à température ambiante avec agitation. La membrane a été révélée avec une solution ECL (*Enhanced chemiluminescence*, Amersham BioScience, Baie d'Urfée, Canada). Finalement, les protéines ont été détectées par autoradiogramme avec un Film Kodak X-Omat Blue XB-1 (Perkin Elmer, Ontario, Canada).

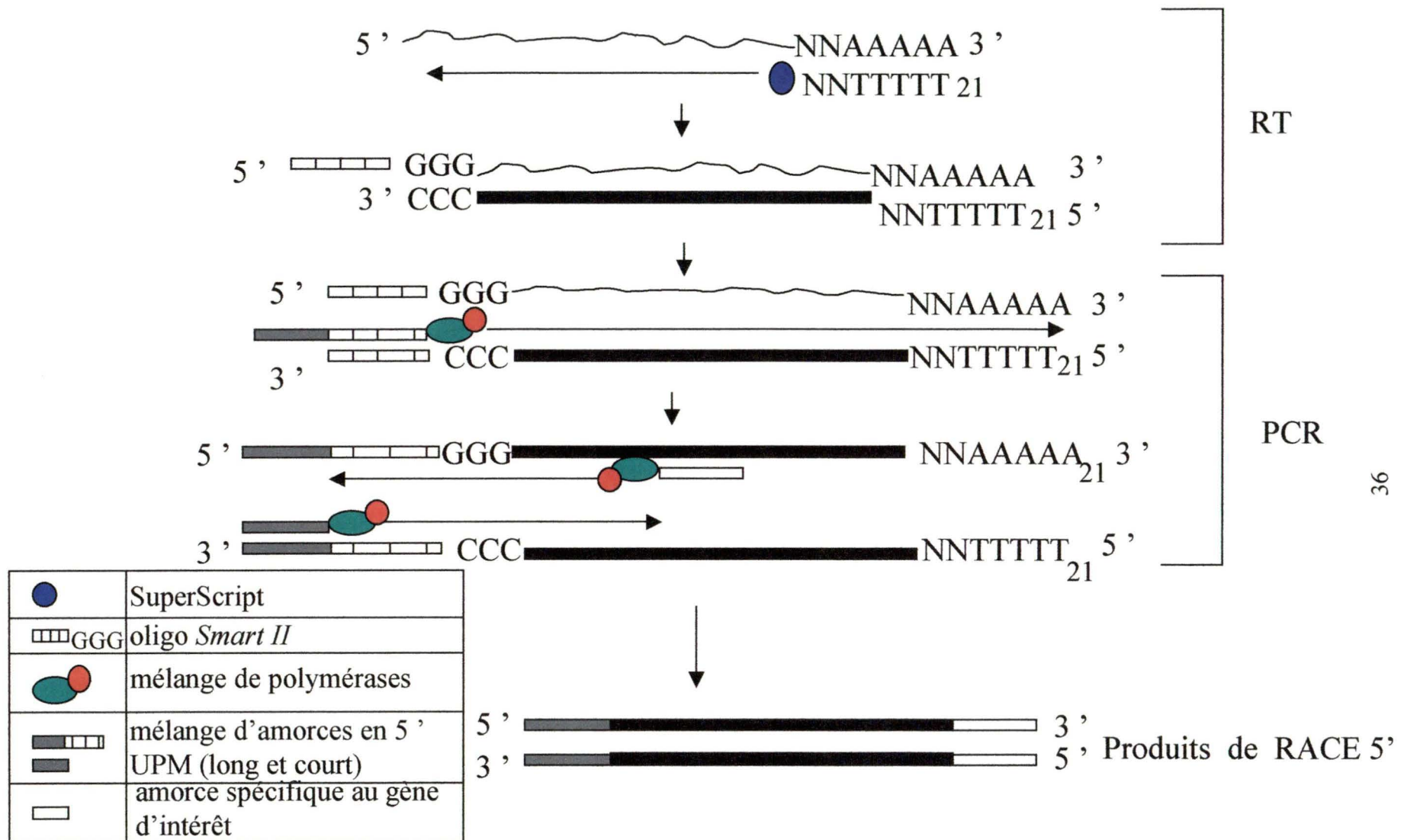


#### **4 L'isolation des fragments d'ADNc inconnus de CA 125 par la technologie de Smart<sup>TM</sup>Race (Clontech, California, USA)**

La technologie Smart<sup>TM</sup>Race (RACE) fait appel à la transcription inverse (RT) et à la réaction d'amplification (PCR). Tout d'abord, la transcription inverse des ARNm est réalisée avec l'enzyme PowerScript à partir d'un oligo dT modifié. Cette enzyme ajoute entre 3 et 5C à l'extrémité 5' des premiers brins ADNc. Ensuite, l'oligo *Smart II* comprenant trois G en 3' est hybridé au niveau de ces C. Finalement, l'amplification d'un fragment d'ADNc du gène d'intérêt est réalisée à partir d'un mélange d'amorces en 5' qui est spécifique à l'oligo *Smart II* ajouté et d'une amorce en 3' qui est spécifique au gène d'intérêt (figure 7).

##### **4.1 Transcription inverse :**

La transcription inverse (RT) a été réalisée à partir de 1µg d'ARN totaux de la lignée NIH:OVCA3 (isolé par Trizol), de la lignée COS-7 (isolé par Trizol), ou du placenta humain (Clontech, California, USA) en suivant le protocole du fabricant. Ces RT ont été effectuées, pendant 1,5hres à 42°C, avec l'enzyme PowerScript<sup>TM</sup> Reverse Transcriptase (Clontech, California, USA). L'amorce utilisée est un oligo (dT) avec deux positions dégénérées en 3' (5'-(T)<sub>25</sub>N<sub>1</sub>N-3'). Lors du RT, un oligo *SMART II* (5'-AAGCAGTGGTAACAACGC AGATACGCGGG-3', fourni par le kit) a aussi été ajouté



**Figure 7: Amplification de l'extrémité 5' d'un ADNc spécifique par la technologie de SMART<sup>TM</sup> RACE(Clontech).** Cette technologie fait appel au RT-PCR. La transcription inverse des ARNm est réalisée à partir d'un oligo dT modifié. Le PCR est effectué avec un mélange d'amorces en 5' (UPM long et court) spécifique à l'oligo *SMART II* et une amorce en 3' spécifique à l'ADNc d'intérêt.

à l'extrémité 3' des ADN simples brins nouvellement synthétisés. Cet oligo est nécessaire au PCR. Les réactions de RT ont été arrêtées en chauffant 7min à 72°C avec un tampon Tricine-EDTA et conservée à -20°C.

#### 4.2 Réaction d'amplification :

Les réactions d'amplification (PCR) ont été effectuées avec à partir de 2,5µl de RT en suivant le protocole du fabricant. Une amorce spécifique à CA 125, 5' FLJ14303 (5'GGTCGTAGGTCCAGACAGGGAG-3', 10µM ; Invitrogen, San Diego, USA), a été utilisée en 3' et un mélange d'amorces spécifiques à l'oligo *SMART II, Universal Primer Mix* (Long: 5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTAACAACGCAGAGT-3' 0,04µM et Short : 5'-CTAATACGACTCACTATAGGGC-3' 0,2µM, Clontech), a été utilisé en 5' du bout de l'ADNc. Les mélanges pour les réactions de PCR ont été chauffés 30 sec à 94°C, 1min 30 sec à 75°C et 3min à 72°C pendant cinq cycles. Ensuite, ils ont été chauffés 30 sec à 94°C, 1min 30 sec à 73°C, 3min à 72°C pendant 5 cycles. Finalement, ces mélanges ont été incubés 30 sec à 94°C, 1min 30 sec à 71°C et 3min à 72°C pendant 27 cycles à l'aide d'un mélange de polymérases dans un appareil Perkin-Elmer.

#### 4.3 Clonage des produits de RACE

Les produits de RACE ont été analysés sur gel d'agarose, extraits du gel, ligués dans le vecteur pScreen-1-T-vector (Novagen, Damstadt, Germany) et transformés par choc thermique dans les bactéries XL-1 Blue pLys S end A- (Stratagen, Lajolla, USA).

#### 4.4 Criblage des colonies par hybridation (Grunstein and Hogness, 1975)

Les colonies XL-1 Blue transformées ont été incubées toute la nuit à 37°C sur une membrane de nylon Hybond N<sup>+</sup> (Amersham LIFE SCIENCE #RNP203B, Baie d'Urfé, Canada) préalablement déposée sur un milieu sélectif. La membrane avec les colonies vers le haut a été séquentiellement déposée sur un whatman saturé 3min avec 10%SDS, 5min avec la solution dénaturante (1,5M NaCl et 0,5M NaOH), 5min avec la solution neutralisante (1,5M NaCl et 0,5M Tris-HCl pH7.4) et 5min avec la solution SSC 2X (3M NaCl et 300mM Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>·2H<sub>2</sub>O, pH7,0) afin de libérer les ADN. Les ADN ont été fixés sur la membrane 2min dans le Stratalinker 2400 (Stratagen, Vancouver). La membrane a été incubée 5min dans la solution SSC 2X et préhybridée 1hre à 42°C dans la solution de préhybridation [50% formamide déionisé, SSC 5X, Denhardt's 1X (2% Ficoll, 2% polyvinylpurolidone et 2% sérum d'albumine bovin), 1mg/ml hering sperm DNA dénaturé, 2% SDS et 0,5% lait en poudre faible en gras]. La membrane a été, ensuite, hybridée toute la nuit à 37°C dans la solution de préhybridation avec 5X10<sup>6</sup> cpm de sonde préalablement dénaturée 5min à 100°C. Nous avons utilisé deux sondes spécifiques à MUC16 (l'amorce MUC16 :5'-CCCAGAGGTTTCCAGGTGCACTGC-3' et l'amorce 5' FLJ14303 5'GGTCGTAGGTCCTCCAGACAGGGAG-3'). La membrane a été lavée deux fois 1hre avec agitation dans du tampon SSC 0,25X. Les colonies positives ont été détectées par autoradiogramme avec un film Kodak X-AR (Perkin Elmer; Ontario, Canada). Certains clones positifs ont été piqués, amplifiés et leurs ADN ont été séquencés à l'aide du séquenceur automatique (Bio S & T Inc., Lachine, Canada).

## **5 La détection des transcrits de CA 125 et de FLJ14303 (protéine hypothétique)**

### **5.1 Extraction des ARN totaux par trizol**

Les cellules NIH:OVCAR-3 ont été cultivées dans un flacon 75 cm<sup>2</sup> (VWR, Mont-Royal, Canada) jusqu'à confluence. Ensuite, elles ont été rincées avec du PBS 1X froid et lysées avec 2ml de Trizol Reagent (Gibco/BRL, Ontario, Canada). Par la suite, le lysat a été incubé 5min à température ambiante dans des eppendorfs. Après, les ARN ont été isolés en ajoutant 200µl de chloroforme:isoamyl (24:1) à chaque ml de trizol et en incubant 3min à température de la pièce. La centrifugation à 13 000 rpm dans une microcentrifugeuse (Micromax Thermo IEC), pendant 15min à 4°C, a été réalisée afin de permettre la formation de deux phases. Les ARN ont été précipités en ajoutant à la phase aqueuse 500µl d'isopropanol par ml de trizol et en incubant 10min à température ambiante. Les ARN ont été culottés par centrifugation à 13 000 rpm pendant 10min à 4°C dans une microcentrifugeuse (Micromax Thermo IEC). Le culot a été lavé avec 1ml d'éthanol 75%, ensuite séché, resuspendu dans 30µl d'eau DEPC (Diethyl Pyrocarbonate, Sigma) et incubé 10min à 55-60°C. Finalement, les ARN ont été dosés à 260nm avec une lampe UV (ultraviolet) dans un spectrophotomètre (Beckman Coulter Du640B; California, USA). La qualité d'ARN a été vérifiée sur gel d'agarose 1% (1g agarose dans 100ml de TAE 1X:40mM Tris base, 0,1% (v/v) acide acétique glacial et 1mM EDTA pH8) contenant 2,5mM de bromure d'éthidium. Les ARN ont été dilués 1/10 dans un tampon de migration (0,25% bleu bromophénol, 0,25% xylène cyanol FF et 30% glycérol) et détecté aux rayons UV.

## 5.2 Marquage des sondes au $^{32}\text{P}$

*Sonde marquée à l'extrémité 5'* : Dans un volume final de 20 $\mu\text{l}$ , 200ng d'ADN sb spécifique à la  $\beta$ -actine (5'-CGCAGGATGGATGGGGGAGGGCATAACCCC-3') a été marqué avec [ $\gamma$ - $\text{P}^{32}$ ]dATP (50 $\mu\text{Ci}$ , NEN Life Science products, Boston, USA) à l'aide de l'enzyme T4 polynucléotide kinase (New England BioLabs, Missauga, Canada) pendant 45min à 37°C. Ensuite, l'enzyme a été inactivée pendant 10min à 68°C. Finalement, 80 $\mu\text{l}$  de TE 1X (10mM Tris-HCl pH8, 1mM EDTA) a été ajouté à la sonde marquée.

*Sonde marquée par extension d'amorce* : 50-250ng d'ADN double brin spécifique à CA 125 (FLJ14303 complet, 3,5kb) a été dénaturé 5min à 100°C dans un volume final de 14 $\mu\text{l}$ . La sonde a été marquée au [ $\alpha\text{P}^{32}$ ] dCTP (50 $\mu\text{Ci}$ , NEN Life Science products, Boston, USA) à l'aide de 5U de l'enzyme Klenow (USB 27092801) pendant 2,5hres à la température ambiante. La réaction a été arrêtée en incubant 10min à 65°C avec 75 $\mu\text{l}$  de la solution 0,2% SDS 50mM EDTA pH8.

### *Purification des sondes :*

Les nucléotides libres ont été enlevés en purifiant les sondes sur une microcolonne d'exclusion Séphadex G50 (Amersham Pharmacia Biotech, Baie d'Urfé, Canada). Pour ce faire, les microcolonnes ont été resuspendues en vortexant et en centrifugeant 1min à 750 g. Les échantillons ont été appliqués au centre de la microcolonne et centrifugé 1min à 750 g. L'éluat contenant la sonde a été conservé à 4°C.

### 5.3 Analyse Northern

#### *Préparation du gel d'agarose :*

Premièrement, 2g d'agarose a été dissout par chauffage dans 166ml de tampon MOPS 1X ( 22mM MOPS: acide sulfonique 3-[N-morpholino]propane, 50mM sodium acétate, 1mM EDTA, pH7 dans de l'eau DEPC) et laissé refroidit. Ensuite, 34ml de formaldéhyde 37% a été ajouté à cette solution d'agarose. Finalement, le gel a été polymérisé et déposé dans un appareil d'électrophorèse contenant le tampon MOPS 1X.

#### *Préparation des échantillons et migration :*

Chaque échantillon comprenait 6µl ARN total (20-30µg) de différentes lignées cellulaires dans 19µl de tampon d'échantillon (64,5% formamide déionisé, 22,5% formaldéhyde 37% et 12,9% de tampon MOPS 10X). Ces échantillons ont été dénaturés à 65°C pendant 5min. Ensuite, ils ont été immédiatement déposés sur glace. Avant la migration, 2,5µl de tampon de migration a été ajouté à chaque échantillon. Les échantillons ont été migrés à 10mA pendant environ 6hres.

#### *Transfert de l'ARN*

Les ARN ont été transférés sur une membrane Hybond N<sup>+</sup> (Amersham Pharmacia Biotech., Baie d'Urfé, Canada) par capillarité durant la nuit dans une solution SSPE 20X (1,8M NaCl, 200mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10mM EDTA, pH 7,7 dans l'eau DEPC). Après le

transfert, la membrane a été séchée 5-10min à l'air ambiant et traitée aux UV 2min dans l'appareil UV Stratalinker 2400 (Stratagen, LaJolla, USA) afin de fixer les ARN à la membrane.

#### *Préhybridation, hybridation et détection*

La membrane a été incubée 2hres à 55°C dans la solution préhybridation [SET 4X, 0,25mg denatured hering Sperm DNA, 0,1%SDS et Denhart's 10X (2% (w/v) Ficoll, 2% (w/v) polyvinyl pyrolidon, (w/v) 2%BSA)]. Pour une membrane 15 cm X 15 cm,  $1 \times 10^7$  cpm de sonde FLJ14303 marquée par extension d'amorce a été dénaturée 5min à 100°C et ajoutée à 30ml de la solution de préhybridation. Ensuite, la membrane a été lavée deux fois 15min à 55°C et une fois 15min à 65°C. La détection des signaux radioactifs a été réalisée en exposant la membrane à -80°C avec un film Kodak X-AR (Perkin Elmer, Ontario, Canada) et un écran amplificateur. La sonde  $\beta$ -actine a été utilisée afin de quantifier.

### **6 Détection des ARNm traduits de la lignée NIH:OVCAR3**

#### **6.1 Extraction des polysomes (polyribosomes):**

##### *Arrêt de la traduction et lyse cellulaire*

Premièrement, cinq flacons de 225cm<sup>2</sup> confluents pour la lignée NIH:OVCAR3 ont été



incubés 30min avec 3,6 $\mu$ M de cycloheximide (Sigma; Missouri, USA) afin d'arrêter la traduction et de fixer les ribosomes à l'ARNm. Deuxièmement, les cellules ont été trypsinisées en utilisant le mélange trypsine/versène (16/60ml). Après, le culot des cellules a été lavé deux fois avec du PBS 1X contenant 3,6 $\mu$ M de cycloheximide. Ensuite, les polysomes ont été libérés en lysant les cellules avec le tampon NP40 1X (142mM KCl, 2,5mM MgCl<sub>2</sub>, 25mM Hepes, 2mM EGTA, 0,3%NP-40, pH7-7,5 dans l'eau DEPC) supplémenté avec 3,6 $\mu$ M de cycloheximide, 0,2mg/mL d'héparine (Sigma, Missouri, USA) et des inhibiteurs de protéases (AEBSF 1 $\mu$ g/ml, leupeptine 0,5 $\mu$ g/ml, aprotinine 2 $\mu$ g/ml et pepstatine 6,7 $\mu$ g/ml). La lyse a été effectuée 20-30min sur glace en mélangeant aux 5min à l'aide d'une pipette. Par la suite, le lysat cellulaire a été centrifugé trois fois 10min à 4,000 g à 4°C afin d'enlever les débris cellulaires. Finalement, le surnageant a été dosé au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 254nm, avec la lampe UV.

#### *Isolation des polysomes sur gradient de sucrose*

Le surnageant (DO<sub>254</sub> 100-200) contenant les polysomes a été séparé dans deux tubes de 40ml contenant un gradient linéaire de 20-45% de sucrose (sucrose dans le tampon 25mM Tris pH7.5, 150mM NaCl et 5mM MgCl<sub>2</sub> dans eau DEPC). Les tubes ont été centrifugés à 27 000 rpm pendant 4,5hres à 4°C dans une ultracentrifugeuse (Beckman Coulter Optima™ XL-100K Ultracentrifuge, Ontario, Canada) en utilisant un rotor SW28. Des fractions de 500 $\mu$ l ont été récoltées à 4°C, en piquant le bas de chaque tube avec une

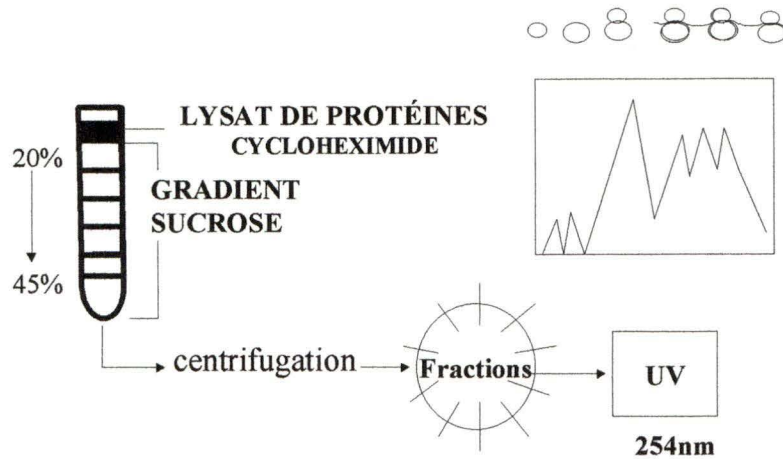
aiguille 27 G1/2 (Becton Dickinson, Ontario, Canada). Afin de déterminer les fractions contenant les polysomes, celles-ci ont été dosées au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 254nm avec une lampe UV.

(figure 8).

## 6.2 Extraction des ARNm

Les ARNm des fractions des gradients sucrose ont été isolés à l'aide de plusieurs extractions phénol/chloroforme:isoamyl (24:1) en utilisant un volume égal d'ARNm et de phénol/chloroforme:isoamyl. Ensuite, ils ont été précipités et lavés à l'éthanol 95%. Après, les ARNm ont été séchés et resuspendus dans 20µl eau DEPC. Finalement, il ont été dosés au spectrophotomètre à 260nm avec la lampe UV et conservé à -80°C. 30µg d'ARN des fractions de l'ARN libre, 40S, 60S, monosomes et polysomes ont été analysés par Northern avec le sonde  $\beta$ -actine et FLJ14303 (3,5kb, C-terminal de CA 125).

## PURIFICATION DES POLYSOMES



**Figure 8 : Extraction des polysomes par centrifugation sur un gradient de sucrose.**

Premièrement, les ribosomes sont fixés aux ARNm en incubant le lysat protéique avec 3,6 $\mu$ M cycloheximide. Ensuite, le lysat protéique est séparé sur un gradient de sucrose 20-45% en centrifugant à 27 000 rpm pendant 4,5hres dans une ultracentrifugeuse Beckman en utilisant un rotor SW28. Finalement, des fractions du gradient sucrose sont recueillies et dosées à 254nm afin d'isoler les polysomes.

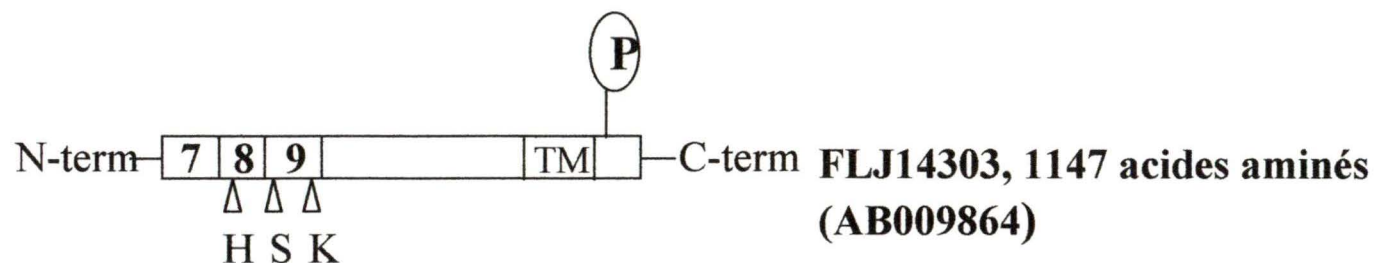
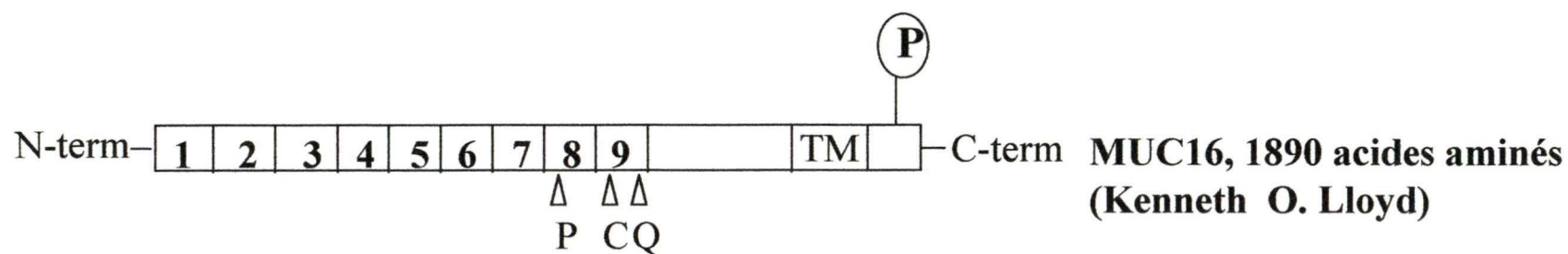
### III. Résultats

L'antigène CA 125 pourrait être impliqué dans le cancer ovarien. En fait, on retrouve un haut niveau de cet antigène dans le sérum d'environ 85% des patientes atteintes de ce type de cancer. Le haut niveau de l'antigène CA 125 est retrouvé presque exclusivement dans les stades avancés du cancer ovarien (Hoskin et al., 2000). De plus, l'antigène CA 125 est fortement exprimé par les cellules épithéliales de l'ovaire cancéreux contrairement à l'ovaire normal où on ne le détecte pratiquement pas. Afin d'étudier le rôle de CA 125 dans le cancer ovarien, particulièrement le cancer ovarien de type épithélial, nous avons utilisé la technologie de RACE (*Rapid Amplification of cDNA Ends*) pour isoler l'ADNc de CA 125. Cette technologie permet d'amplifier les extrémités 5' ou 3' d'un ADNc spécifique à l'aide des techniques de RT-PCR. L'ADNc de CA 125 sera utilisé comme outil pour déterminer son rôle dans le développement du cancer ovarien.

#### **Validation de la protéine hypothétique FLJ14303**

La technologie de RACE nécessite une partie de la séquence d'acides nucléiques de CA 125. Cette séquence nous était inconnue, jusqu'à tout récemment. En 2001, Yin et Lloyd ont cloné un ADNc de 5,9kb incomplet en 5' qui était un bon candidat pour CA

125. Ce clone a été appelé *MUC16* par le séquençage du génome humain. Il fait partie de la famille des mucines dû à la présence en N-terminal de 9 répétitions en tandem de 156 acides aminés riches en sérines, thréonines et prolines constituant un domaine PTS typique des mucines. Il comprend également un domaine transmembranaire en C-terminal et un site potentiel de phosphorylation de type tyrosine kinase (figure 9). Afin d'utiliser le clone *MUC16* pour la technologie de RACE, nous avons exprimé la protéine hypothétique FLJ14303. Le clone FLJ14303 (disponible sur Genbank au numéro AB009864) a été découvert par *Helix Research Institute Full length cDNA projet* et est identifié comme ayant une forte homologie avec le clone *MUC16* dans une recherche de séquences homologues sur GenBank. Il comprend les trois dernières répétitions en tandem de *MUC16* ainsi que le domaine C-terminal. En fait, la comparaison des séquences d'acides aminés du clone FLJ14303 et de *MUC16* montre que le clone FLJ14303 manque les 743 premiers acides aminés de *MUC16*. Les 1147 acides aminés suivants sont identiques mis à part les trois acides aminés situés dans les régions répétées en tandem (figure 9). Nous avons choisi d'exprimer le clone FLJ14303 plutôt que le clone *MUC16*, car il nous était disponible. La protéine hypothétique FLJ14303 a été exprimée de façon transitoire à partir du vecteur pME18S dans la lignée cellulaire COS-7, une lignée négative pour CA 125 lorsqu'elle est analysée par immunobuvardage. Le lysat protéique de la lignée COS-7 transfectée a été analysé par immunobuvardage avec deux anticorps spécifiques à CA 125, OC125 et VK-8. Ces deux anticorps détectent la



$\Delta$  Position d'acides aminés différents

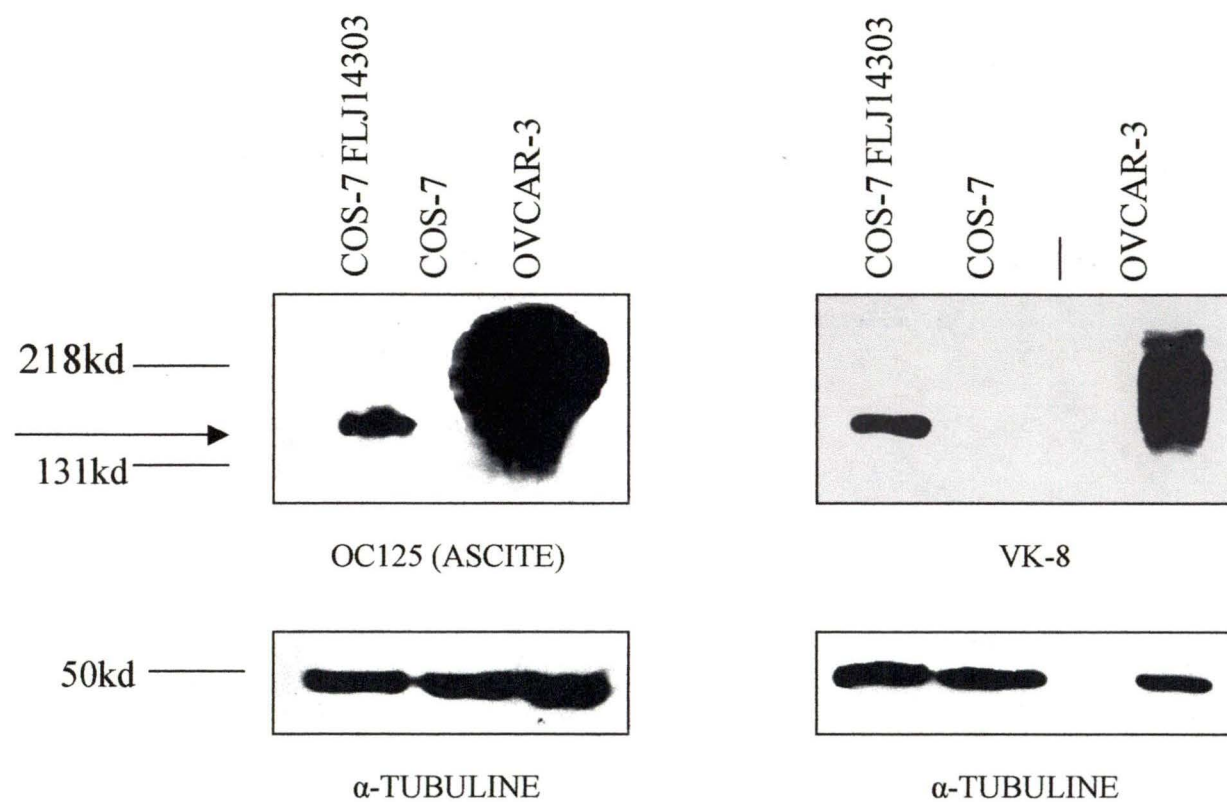
proline (P)	—————→	histidine(H)
cystéine (C)	—————→	sérine (S)
glutamine (Q)	—————→	lysine (K)

**Figure 9: Comparaison des séquences d'acides aminés des clones MUC16 et FLJ14303.** Le clone FLJ14303 ne contient pas les six premières répétitions de MUC16 et a trois acides aminés différents avec le reste de la séquence de MUC16.

protéine hypothétique FLJ14303 à 170KD (figure 10). La protéine hypothétique FLJ14303 possède des épitopes qui sont retrouvés dans la protéine CA 125 ce qui suggère que la protéine hypothétique FLJ14303 soit une partie de la protéine CA125.

### **Isolation des fragments d'ADNc de CA 125 par la technologie de Smart<sup>TM</sup>Race**

Comme nous étions confiants que la protéine encodée par la séquence du clone FLJ14303 correspondait fort probablement à une partie de la séquence de CA 125, nous avons utilisé la séquence du clone FLJ14303 afin d'isoler l'extrémité 5' manquante de *MUC16*. Le RACE a été effectué, tout d'abord, à partir des ARNm des lignées NIH:OVCAR-3 et COS-7 (contrôle négatif). Toutefois, aucune bande a été amplifiée. Nous avons donc effectué le RACE à partir des ARN totaux de ces lignées. La lignée NIH:OVCAR-3 exprime fortement CA125 (>200KD) par immunobuvardage tandis que la lignée COS-7 est négative par immunobuvardage avec les anticorps VK-8 et OC 125 (figure 10). Les cellules COS-7 ont été utilisées comme contrôle négatif pour le RACE. Étant donné que le clone *MUC16* est complet en 3' et incomplet en 5', nous avons utilisé le RACE en 5' afin d'isoler l'extrémité manquante de CA125. La transcription inverse a été réalisée à partir de la queue polyadénylée des ARNm avec une amorce d'oligo dT (thymidine désoxydée) modifiée (5'-(T)<sub>25</sub> N<sub>1</sub>N-3'). Puis, un oligo *Smart II* a été ajouté en 3' de l'ADN nouvellement synthétisé. L'amplification de l'ADN, par PCR, a été réalisée à partir d'un mélange d'amorces 5' spécifiques à l'oligo *SMART II* (*universel*

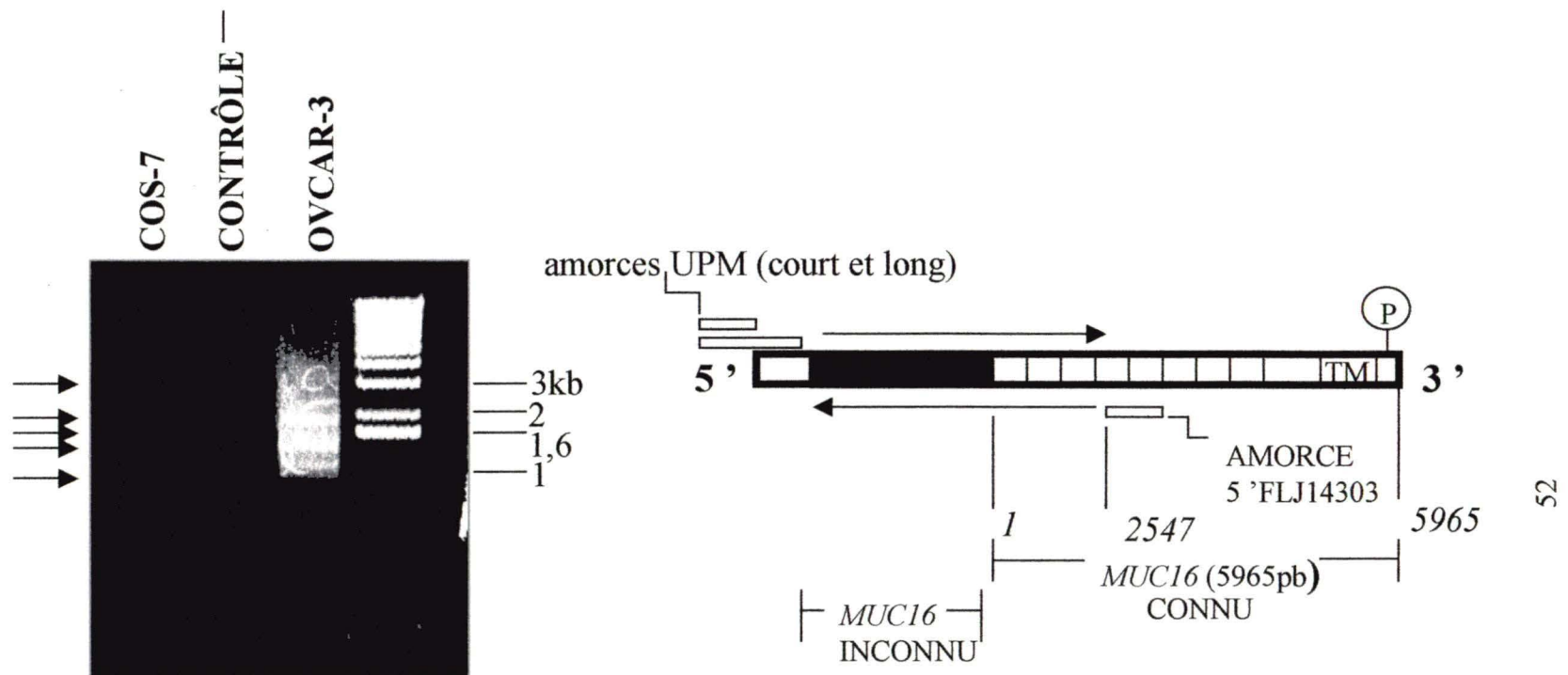


**Figure 10: Détection de la protéine hypothétique FLJ14303 par immunobuvardage, à l'aide de deux anticorps monoclonaux spécifiques à CA125 (OC125 et VK-8). L'anticorps monoclonal  $\alpha$ -tubuline a été utilisé comme contrôle de la quantité de protéines.**

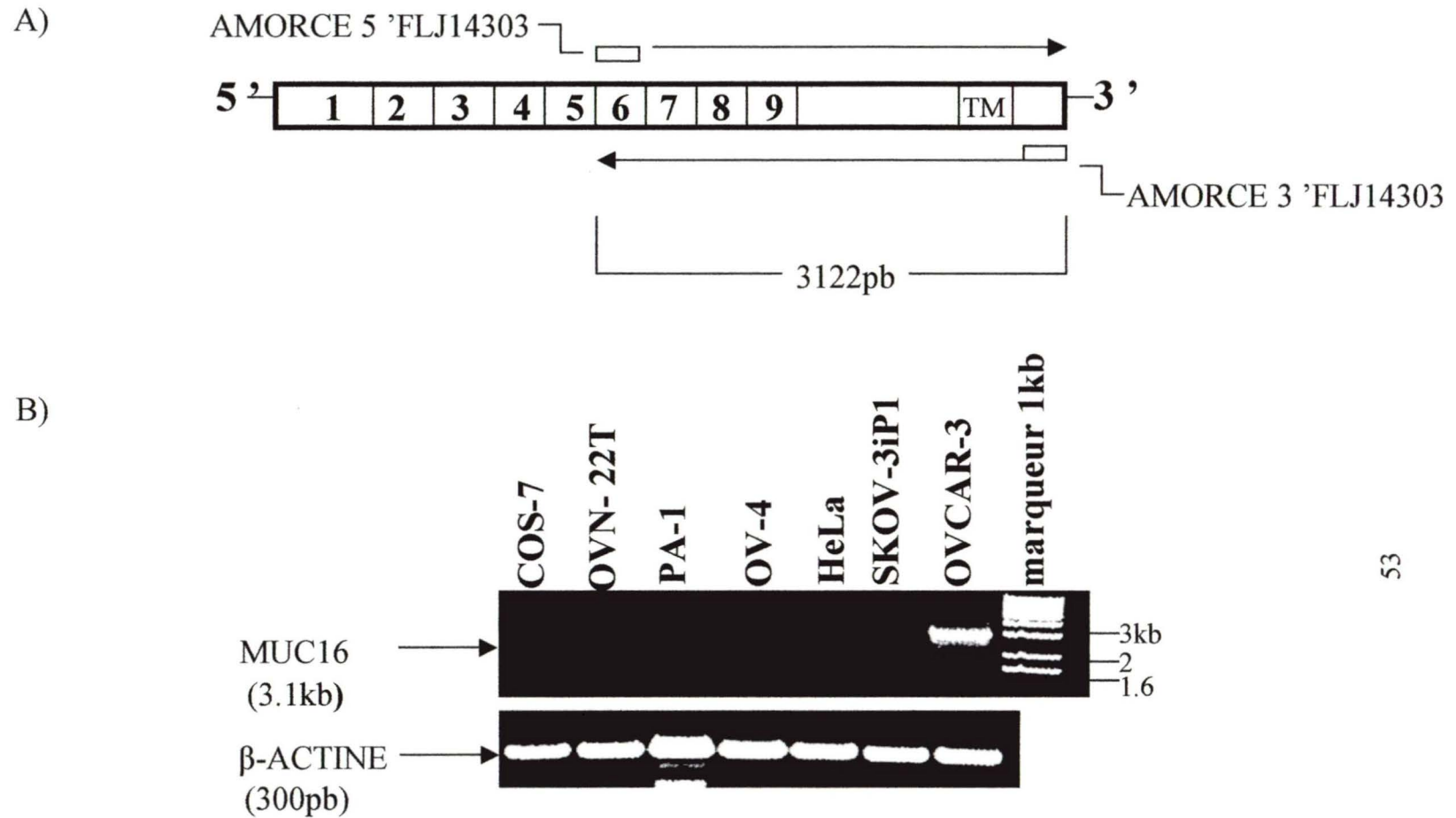


*primer mix long and short*) et d'une amorce 3' spécifique à *MUC16* (amorce 5'FLJ14303). Le mélange d'amorces en 5' favorise une amplification spécifique. Concernant l'amorce 3', elle est située à 2548pb de l'extrémité 5' de *MUC16*. De cette façon, elle se situe dans la région répétée en tandem (figure 11). Malgré que les répétitions en tandem soient très similaires, l'amorce choisie ne s'hybride parfaitement qu'à la position 2548-2569 avec le logiciel [www.genebee.msu.su/service/malign\\_reduce\\_dhtml](http://www.genebee.msu.su/service/malign_reduce_dhtml). L'amorce ne s'hybride pas en 3' sur les autres positions possibles du clone *MUC16*, ainsi l'amplification désirée devrait être efficace. Nous avons confirmé que l'amorce 3' s'hybridait bien au site prédit, en effectuant un RT-PCR à partir des ARN totaux de la lignée NIH:OVCAR-3 (figure 12). L'amorce 5' correspond à la séquence complémentaire et inversée de l'amorce 3' pour le RACE 5' (5'-CTCCCTGTCTGGACC TACGACC-3') et l'amorce 3' correspond à la séquence de *MUC16*, soit deux nucléotides avant le codon STOP (5'- CAGATCCTCCAGGTCTAGGTGT-3'). Nous avons également effectué le RACE en 5' et en 3' ainsi qu'une amplification interne d'un gène contrôle connu, le gène du récepteur de la transferrine (figure 13). Cette expérience est un contrôle pour la technologie de RACE.

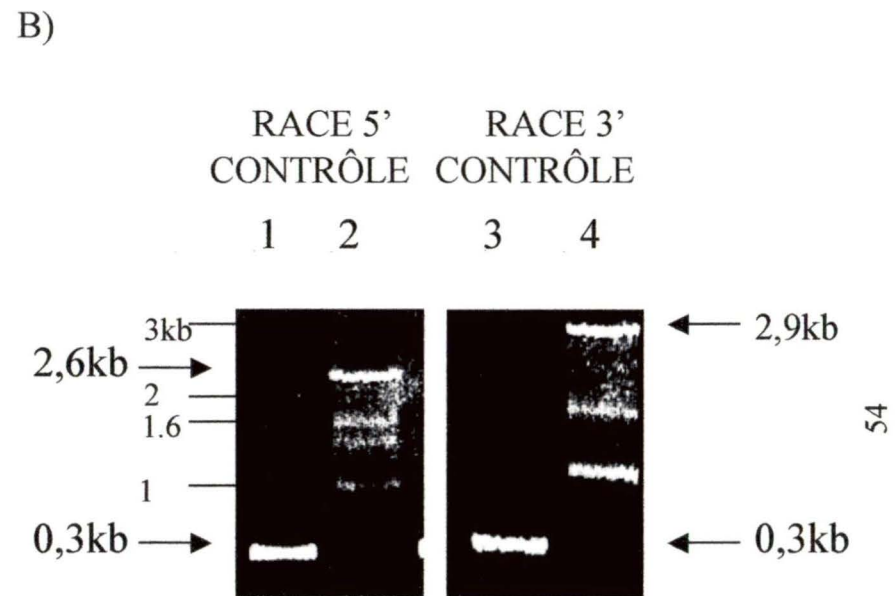
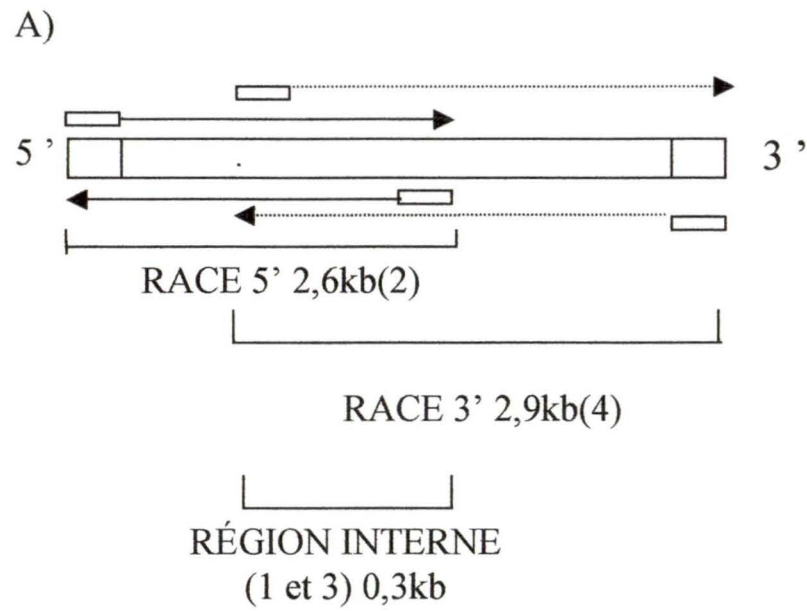
Le RACE 5' réalisé sur les ARN totaux de la lignée OVCAR-3 (RACE 5'/OVCAR-3) permet d'obtenir quatre bandes entre 1kb et 3,5kb. Tandis que pour le RACE 5' réalisé sur l'ARN total de la lignée COS-7 (RACE5'/COS-7), nous observons qu'une bande à environ 2kb (figure11). La lignée COS-7 était utilisée comme contrôle



**Figure 11: Amplification de l'extrémité 5' manquante de MUC16 à l'aide de la technologie du RACE.** Le RACE a été réalisé en utilisant une amorce 3' spécifique à MUC16. Cette amorce se situe à 2547pb de l'extrémité 5' connue. Quatre produits de RACE (1kb-3,5kb) ont été obtenus à partir des ARN totaux de la lignée OVCAR-3 et un produit de RACE (~2kb) a été obtenu des ARN de la lignée COS-7. Le contrôle négatif sans ADN donne aucune bande.



**Figure 12: Amplification de l'extrémité 3' de MUC16 par RT-PCR.** A) L'amplification a été réalisée avec une amorce à l'extrémité 3' de MUC16 et une à 3,1kb de l'extrémité 3'. B) L'amplification a été effectuée à partir des ARN totaux de différentes cellules (COS-7, OVN-22T, PA-1, OV-4, HeLa, SKOV-3iP1 et OVCAR-3). Le RT-PCR de la  $\beta$ -actine est utilisé comme contrôle positif.



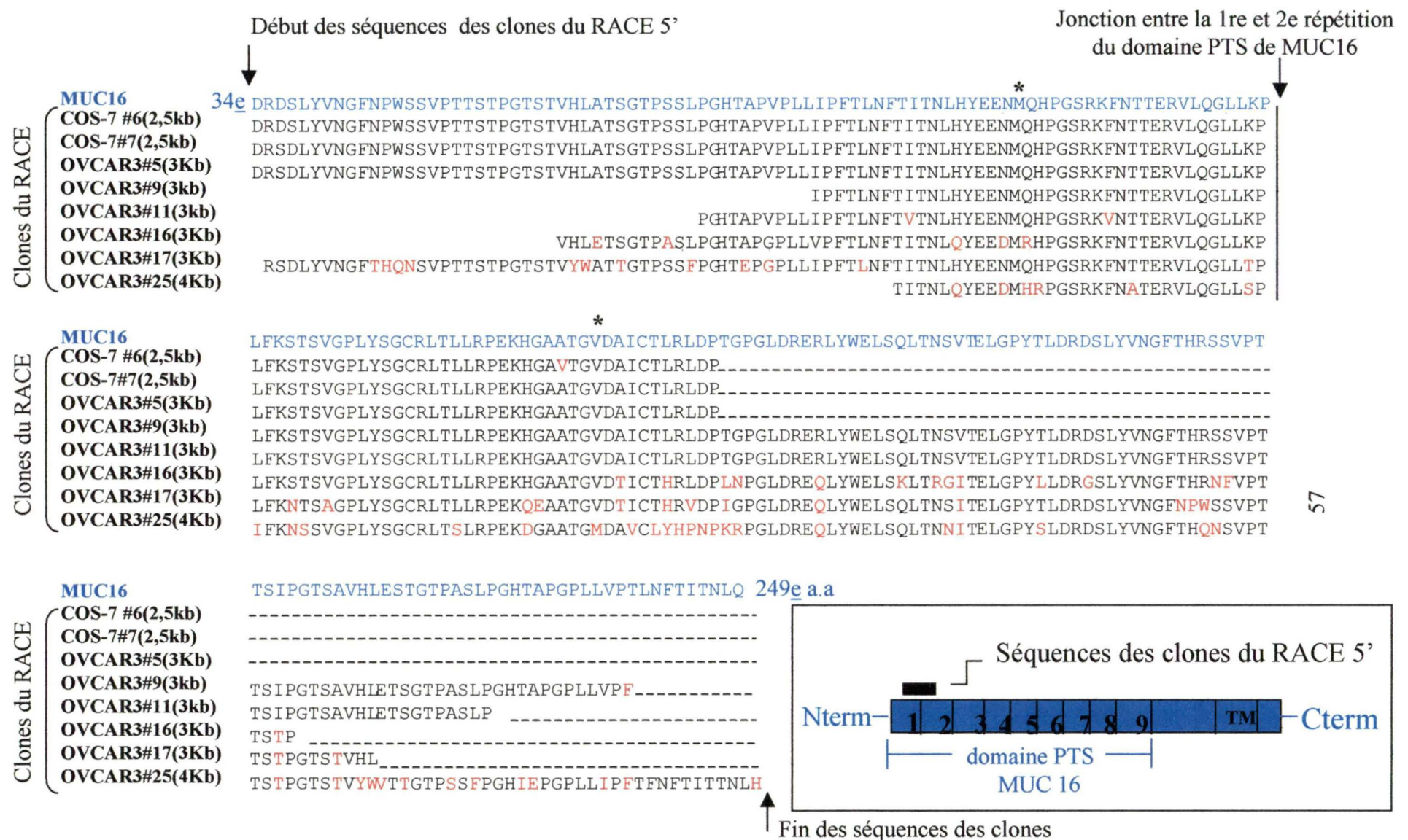
**Figure 13: RACE 5' et 3' du récepteur de la transferrine.** A) Le RACE 5' a été réalisé avec une amorce 3' située à 2,6kb de l'extrémité 5' du récepteur, tandis que le RACE 3' a été réalisé avec une amorce 5' située à 2,9kb de l'extrémité 3' du récepteur. L'amplification d'une région interne (0,3kb) du récepteur de la transferrine a été utilisée comme contrôle positif. B) Les RACE 5' et 3' ont été réalisés à partir des ARN totaux de placenta humain.

négatif, car nous ne détectons pas CA 125 par immunobuvardage. Toutefois, nous ne remarquons pas de bande à 2kb avec le RACE5'/OVCAR-3. Le RACE 5' a été réalisé trois fois et donne des résultats semblables.

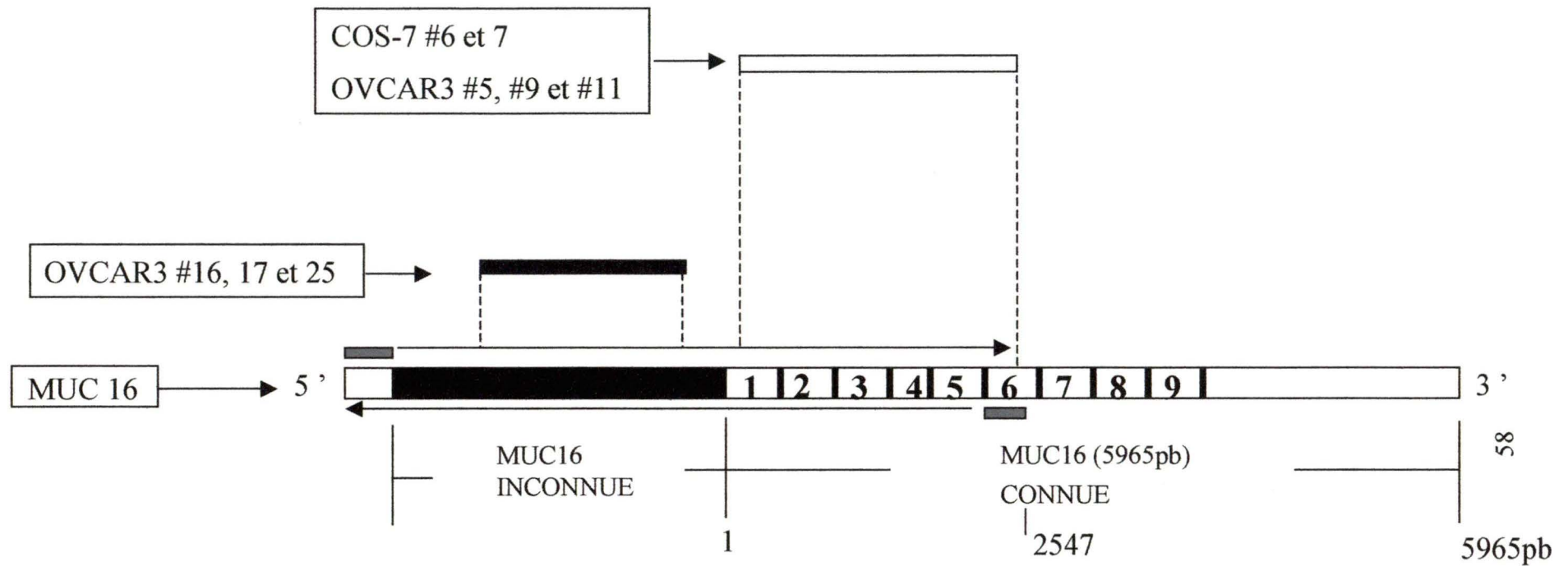
Les produits de RACE5'/OVCAR-3 et RACE5'/COS-7 ont été clonés dans le vecteur *pScreen-I-T-vector* et transformés dans des bactéries *XL-1 Blue*. Les clones positifs ont été sélectionnés par hybridation avec deux sondes spécifiques à la région répétée en tandem de *MUC16* (l'amorce MUC16 [située à 643pb de l'extrémité 5'] et l'amorce 5'FLJ14303 [située à 2547pb de l'extrémité 5']). Ensuite, la longueur des inserts a été vérifiée par digestion enzymatique, avec Sal1. Cette enzyme permet de linéariser le vecteur. D'après la longueur du vecteur linéarisé, les inserts se situent entre 1 et 3kb (figure non montrée). La longueur minimale attendue des inserts est de 2,5kb. Ainsi, nous avons décidé d'analyser par séquençage, seulement les clones avec des inserts  $\geq 2,5$ kb. Huit clones ont été analysés par séquençage. Parmi ces huit clones, deux proviennent du RACE5'/COS-7 (#6 et #7) et six proviennent du RACE5'/OVCAR-3 (#5, 9, 11, 16, 17, 25). Les clones ont, tout d'abord, été séquencés aux extrémités. Les séquences en 3' des inserts correspondent à la séquence de *MUC16* à partir de la position 2548-2569. Ainsi, l'amorce 3' (5'FLJ14303) semble s'être hybridée à l'endroit désiré. Les séquences en 5' de l'insert varient selon les clones. Par alignement des séquences en utilisant des logiciels sur Internet ([www.genebee.msu.su/services/malign\\_reduced.htm](http://www.genebee.msu.su/services/malign_reduced.htm) et [www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html)), nous avons constaté que toutes les

séquences en 5' font partie de la région répétée en tandem de CA125. La première réaction de séquence en 5' des clones #5, 6, 7, 9 et 11 correspond probablement à une partie de la première et deuxième répétition en tandem de MUC16, tandis que les séquences en 5' des clones 16, 17 et 25 semblent différentes. La séquence en acides aminés des clones #5, 7 et 9 sont identiques à celle de MUC16, tandis que les clones #6 et 11 ont un et deux acides aminés de différents. Pour une même longueur de séquence, les clones # 16, 17 et 25 ont entre 13 et 18 acides aminés de différents par rapport au clone MUC16 (figure 14 et 15). Afin de s'assurer que les séquences en 5' obtenues par RACE sont complètes, nous avons répété le RACE 5' en utilisant, cette fois-ci une amorce 3' davantage à la proximité de l'extrémité 5' de MUC16 (RACE5'#2 [situé à environ 300pb de l'extrémité 5' des produits de RACE] 5'CAGGTCTGAGCAAGGTCA GTCTG-3') (figure 16). Une bande majoritaire à 300pb, ainsi que des bandes faibles entre 0,5 et 2kb ont été obtenues (figure 16). Les bandes n'ont pas été clonées et séquencées dû à leur faible niveau et à la présence de plusieurs bandes. Ainsi, il est difficile d'évaluer si le deuxième RACE 5' a permis d'aller plus loin que le premier RACE. De plus, étant donné que la séquence en 5' de *MUC16* est inconnue et que les répétitions sont très similaires, il est difficile de synthétiser des amorces spécifiques. Toutefois, la séquence de *MUC16* ainsi que les produits du premier RACE 5' possèdent des séquences d'initiation de la traduction (ATG) dans le bon cadre de lecture et ayant une forte ressemblance avec la séquence consensus d'initiation de la traduction chez les



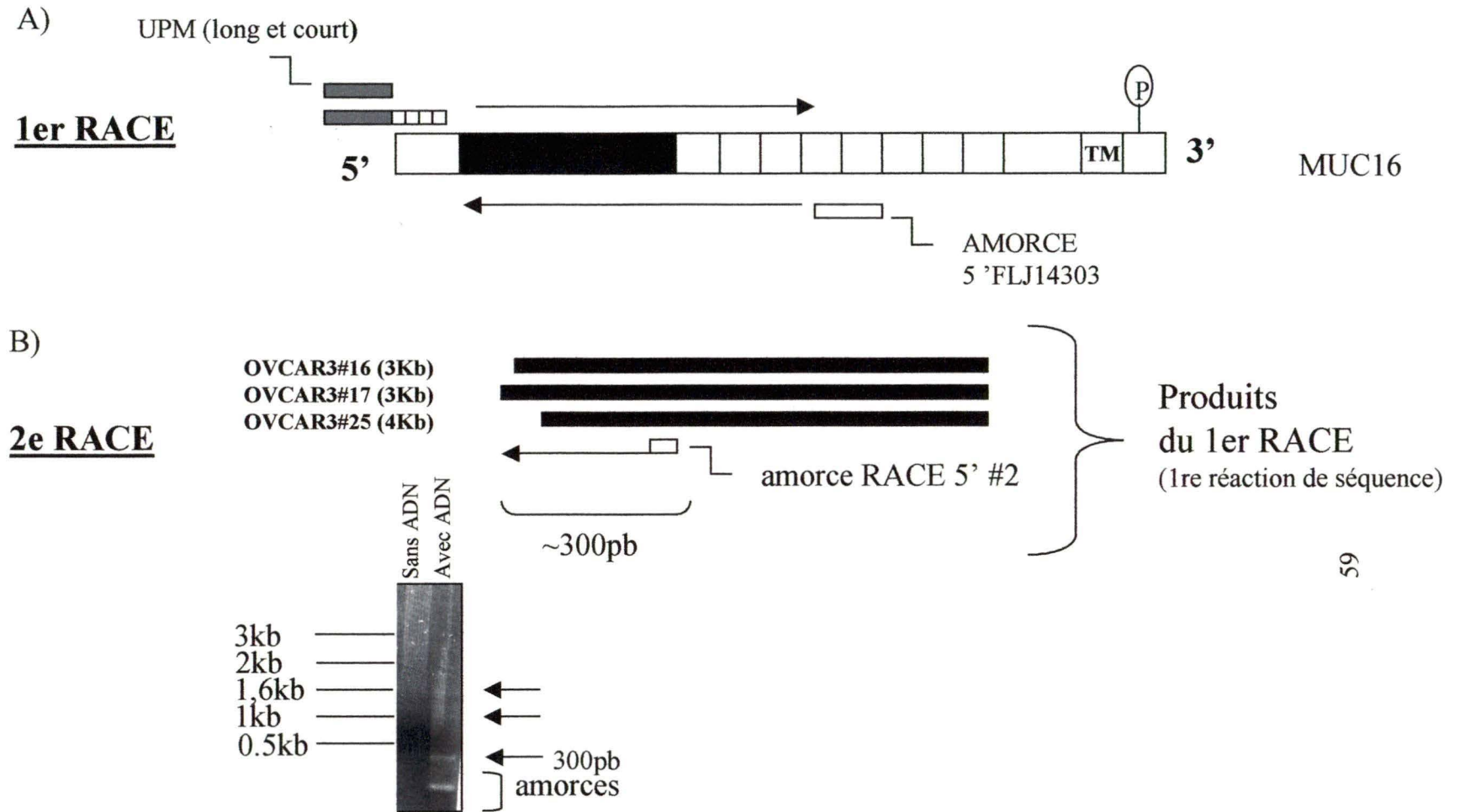


**Figure 14: Alignement des séquences d'acides aminés des produits du premier RACE 5' avec la séquence de MUC16.** La séquence des clones du RACE 5' (séquence en noir et rectangle noir) est alignée avec la séquence d'acides aminés de la protéine MUC16 (séquence bleu et rectangle bleu) au niveau de la 1re et 2e répétition dans le domaine PTS. Nous avons représenté les 220 premiers acides aminés des clones de RACE. Les clones isolés par RACE 5' possèdent environ 840 acides aminés. Les acides aminés rouges correspondent aux acides aminés qui sont différents de MUC16. Les astérisques représentent les méthionines qui peuvent être utilisées pour l'initiation de la traduction. L'alignement a été réalisé à l'aide du site [www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html).



**Figure 15: Schématisation de l'alignement des séquences du premier RACE 5' avec la séquence de MUC16.** Les clones #5, 6, 7, 9 et 11 représentent des répétitions de *MUC16*. Les réactions de séquences aux extrémités de ces clones représentent la région des 6 premières répétitions en tandem de *MUC16*. Seul le clone #7 a été séquencé au complet et celui-ci correspond bel et bien aux 6 premières répétitions en tandem. Tandis que les clones #16, 17 et 25 possèdent des répétitions différentes de celles connues de *MUC16*. La localisation de ces clones est fictive étant donné qu'on ne connaît pas la séquence complète de *MUC16*.





**Figure 16: Amplification de l'extrémité 5' manquante de MUC16 par RACE.** A) L'amorce 3' utilisée se situait à environ 2,5kb de l'extrémité 5' de MUC16 pour le premier RACE. B) L'amorce 3', pour le deuxième RACE, se situait à environ 300pb de l'extrémité 5' des produits du premier RACE. Une bande majeure, mais faible, a été obtenue à environ 300pb. Des bandes très faibles entre 0,5kb et 2kb sont également observées avec le deuxième RACE.

vertébrés, GCCA/GCCAUGG (Kosak, 1987). Ces séquences ATG pourraient être utilisées pour initier la traduction (tableau 1 et figure 14). Donc, une ou des séquences du premier RACE 5' pourraient correspondre à une extrémité 5' manquante de MUC16.

### **Détection des transcrits de CA 125**

Afin de déterminer la taille approximative de l'extrémité 5' manquante du clone *MUC16*, une analyse Northern a été réalisée avec une sonde spécifique à CA 125 (sonde FLJ14303; séquence complète du clone FLJ14303). Le transcrit de CA 125 a été analysé dans différentes lignées cellulaires de cancer ovarien (NIH:OVCAR-3, SKOV-3ip1, SKOV-3, OV-4 et PA-1), dans des cellules primaires d'ovaire normal (OVN-T) ainsi que dans les lignées COS-7 et HeLa (figure 17). La lignée NIH:OVCAR-3 et HeLa sont fortement positives pour CA 125 par immunobuvardage tandis que la lignée SKOV-3ip1 l'est modérément. Les lignées OV-4, SKOV-3, PA-1 et les cellules primaires OVN-22T sont négatives pour CA 125 par immunobuvardage. Le résultat de l'analyse Northern de ces différents types cellulaires révèle plusieurs transcrits dans chaque type cellulaire. Les bandes observées dans les lignées négatives par immunobuvardage pour CA 125 migrent au même endroit que celles observées dans les lignées positives suggérant que ces bandes soient positives. Il y a au moins huit transcrits situés entre 1kb et environ 35kb et le patron des transcrits varie selon le type cellulaire. Par exemple, les transcrits >12kb ne sont pas observés dans les cellules primaires de l'ovaire, excepté pour les cellules OVN-

A)

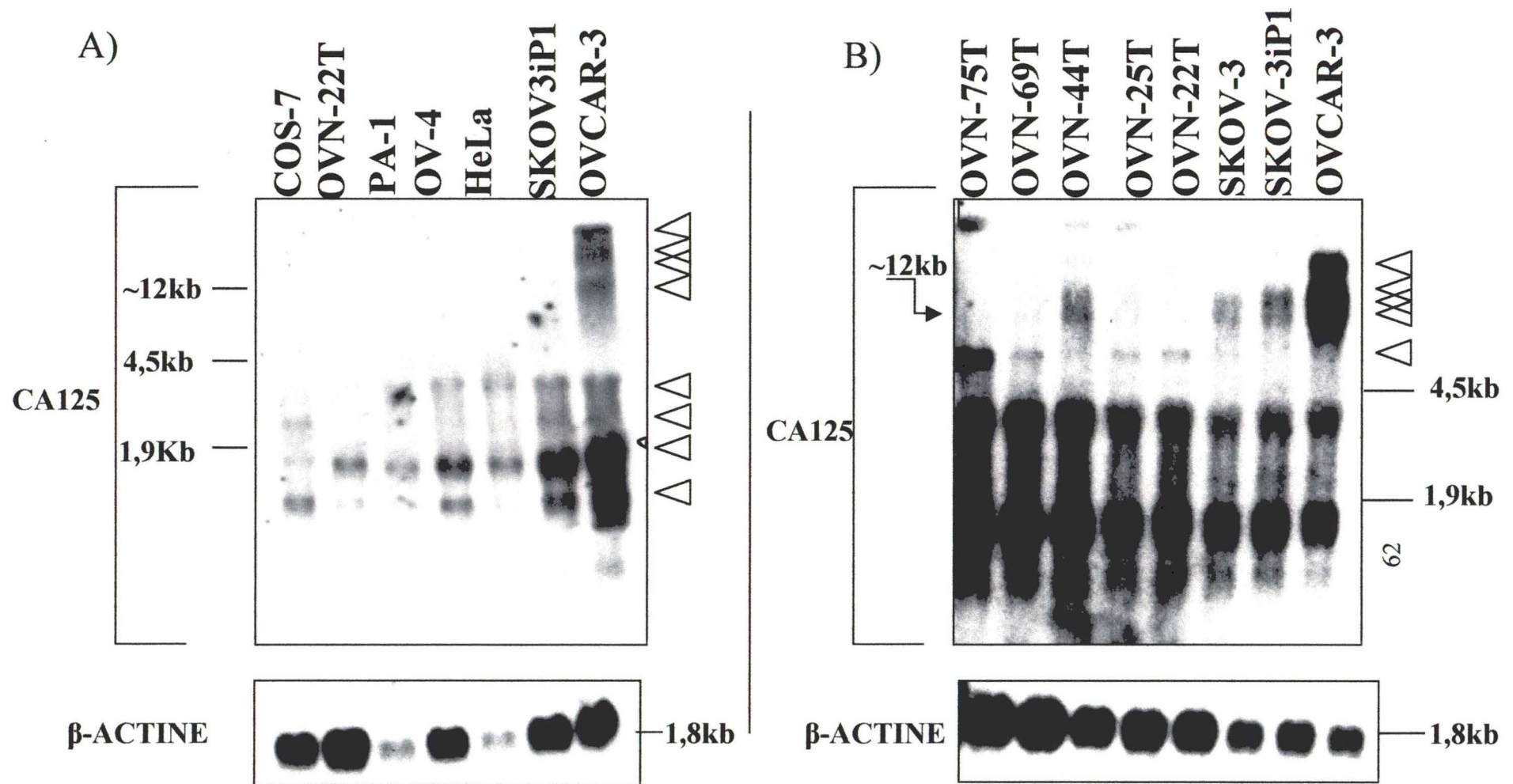
POSITION	:	-6	-5	-4	-3	-2	-1	0	+1	+2	+3	+4
POURCENTAGE DE A	:	17	18	25	<u>61</u>	27	15					23
POURCENTAGE DE C	:	19	<u>39</u>	<u>53</u>	2	<u>49</u>	<u>55</u>					16
POURCENTAGE DE G	:	<u>44</u>	23	15	36	13	21					46
POURCENTAGE DE T	:	20	20	7	1	11	9					15

B)

CONSENSUS KOSAK	GCCA/GCCA <u>UGG</u>	347/322
CLONE #5, 6, 7, 9, 11, 16 ET 17	GAAA ACA <u>UGC</u>	246
CLONE #25	GAGG ACA <u>UGC</u>	211
	AGAA GGA <u>UGG</u>	176
CLONE MUC16	ACAG CCA <u>UGG</u>	292
	AGCA GCA <u>UGG</u>	268
	GAGA ACA <u>UGG</u>	266
POSITION:	-6-5-4 -3 -2-1 +4	% total

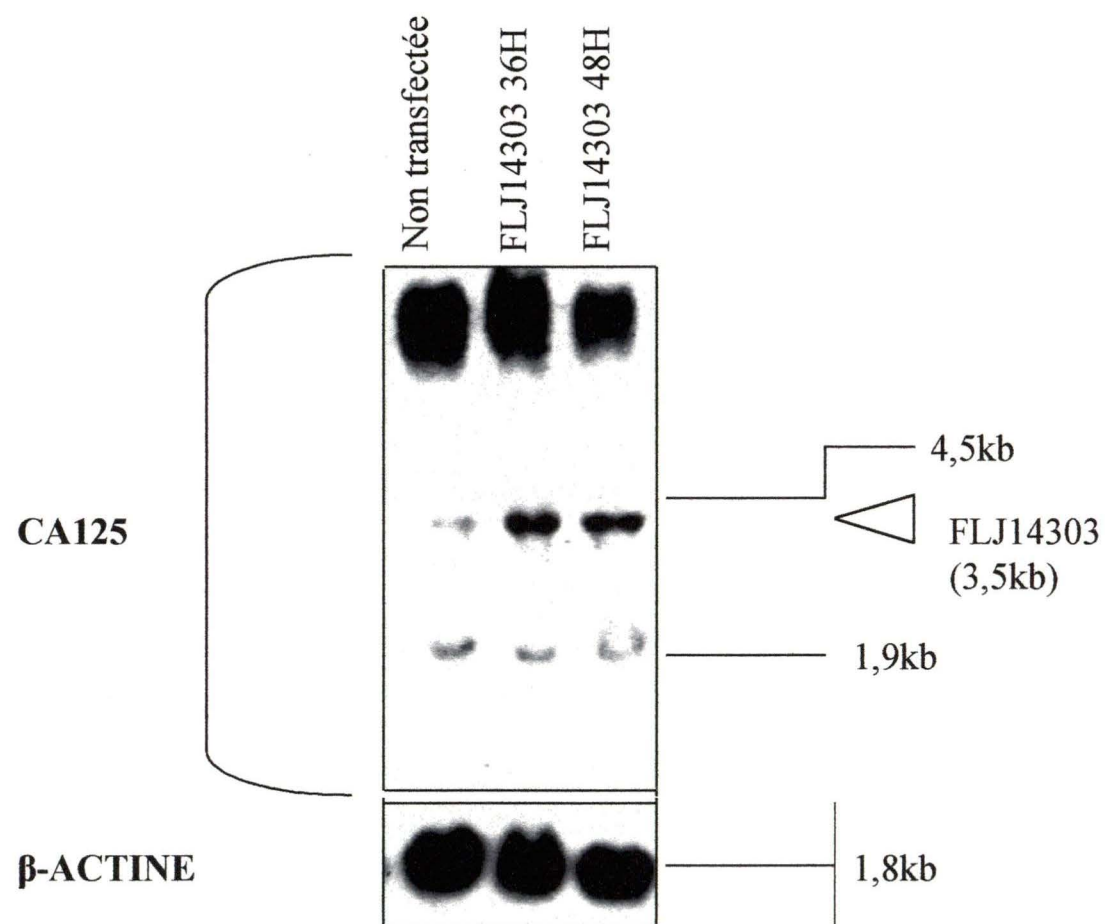
61

**Tableau 1:** A) Fréquence des A, C, G et T autour du codon ATG d'initiation de la traduction chez les ARNm de 699 vertébrés. B) Comparaison des séquences acides nucléiques autour de certains ATG des clones du premier RACE5' (#5, 6, 7, 9, 11, 16, 17 et 25) et de *MUC16* avec la séquence du consensus de la boîte Kosak.



**Figure 17: Visualisation des ARNm de CA125 par l'analyse Northern avec la sonde FLJ14303 (C-terminal de CA125, 3,5kb).** A) Les ARN totaux (20µg) de différentes lignées cellulaires (COS-7, PA-1, OV-4, HeLa, SKOV-3ip et OVCAR-3) et de cellules primaires (OVN-22T) ont été analysés par l'analyse Northern. B) Comparaison des ARNm de CA125 dans les cellules primaires d'ovaire normal (OVN-22T, 25T, 44T, 69T et 75T) et les lignées cellulaires de carcinome ovarien.

44T. Aussi, l'intensité des transcrits varie selon le type cellulaire lorsque nous comparons avec la  $\beta$ -actine (contrôle interne). La lignée NIH:OVCAR-3 se distingue des autres, car elle exprime tous ces transcrits et certains de ces transcrits semblent être retrouvés à des grandes tailles. Un des transcripts semble migrer autour de 3,5kb lorsque nous comparons avec la taille des ARN ribosomiaux 18S (1,9kb) et 28S (4,5kb), soit la même taille du clone FLJ14303 (protéine hypothétique). En fait, la transfection transitoire du clone FLJ14303 (pAdTrack/FLJ14303) dans la lignée NIH:OVCAR-3, suggère que le transcrit de FLJ14303 migre au même endroit qu'un transcrit endogène lorsque nous analysons les ARN totaux avec la sonde FLJ14300 (figure 18, Nathalie Cloutier, stagiaire). Nous remarquons une augmentation de l'intensité du transcrit à environ 3,5kb dans la lignée NIH:OVCAR-3 lorsqu'elle est transfectée avec le clone FLJ14303. L'analyse de la  $\beta$ -actine nous indique que nous avons déposé une plus grande quantité d'ARN pour les cellules non transfectées que pour les cellules transfectées. Cela nous confirme qu'il y a bel et bien une augmentation du transcrit à environ 3,5kb lorsque nous transfectons le clone FLJ14303 dans la lignée NIH:OVCAR-3. La transfection du clone FLJ14303 a été réalisée dans une lignée positive pour CA 125, car nous voulions déterminer si le transcrit FLJ14303 pouvait être un transcrit endogène. Les différences observées entre les figures 17 et 18 au niveau des transcrits de CA 125 proviennent fort probablement de la résolution du gel et de l'exposition de la membrane de l'analyse Northern. La bande large observée dans la figure 18 contient probablement les quatre transcrits de la figure 17.



**Figure 18:** Visualisation par l'analyse Northern du transcrit FLJ14303 dans la lignée NIH:OVCAR-3. Cette lignée a été transfectée ou non de façon transitoire pendant 36 et 48 heures avec le vecteur pAdTrack/FLJ14303. La sonde utilisée est le clone FLJ14303 (~3,5kb).

Le clone FLJ14303 a été isolé à l'aide d'une librairie humaine d'ADNc construite par la méthode *oligo-cappin* (Gubler and Hoffman, 1983). Théoriquement, cette méthode permet l'isolation des ADNc complets en 5'. La séquence du clone FLJ14303 contient une séquence ATG en 5' dans le bon cadre de lecture. Le clone FLJ14303 pourrait être un isoforme complet de CA 125. En ce qui concerne les produits de RACE, ils pourraient également être des transcrits complets de CA 125. Les séquences des produits de RACE ajoutent entre 0,5kb et 1kb en 5' du clone de *MUC16* (5,9kb). L'analyse Northern de la figure 17 illustre des transcrits >4,5kb. De plus, comme nous l'avons mentionné précédemment, les produits du premier RACE 5' possèdent au moins une séquence ATG pouvant être utilisée pour l'initiation de la traduction. Toutefois, ces codons d'initiation de la traduction n'ont pas été confirmés par l'analyse in vitro. Donc, ils existent au moins huit transcrits de CA 125. Le nombre et l'intensité des transcrits de CA 125 varient selon le type cellulaire et un de ces transcrits pourrait correspondre au clone FLJ14303.

### **Détection des ARNm traduits de CA 125**

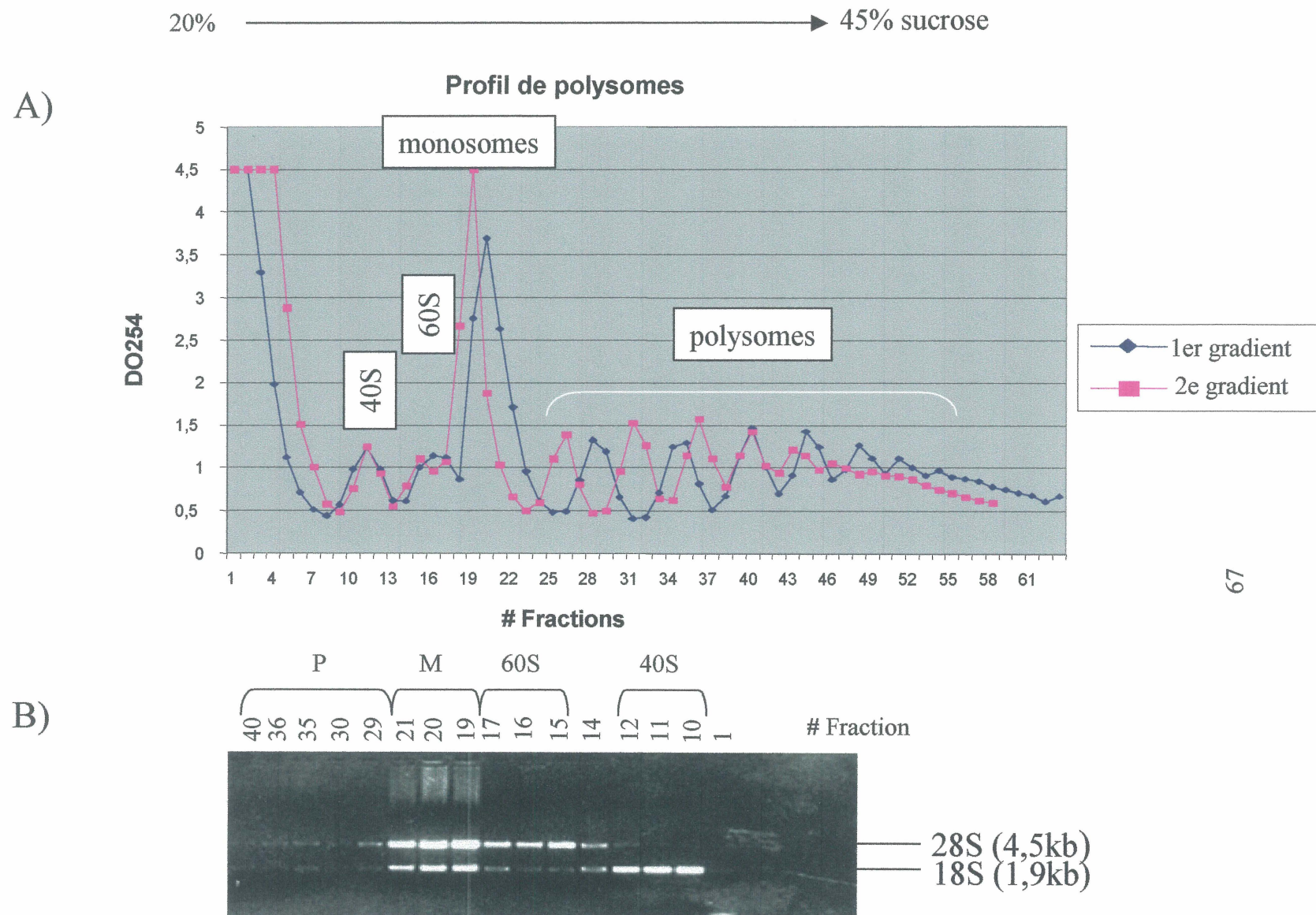
L'analyse Northern des transcrits de CA 125 ne nous informe pas sur les transcrits traduits de CA 125. Nous avons donc voulu déterminer les transcrits traduits de CA 125 en isolant les polyribosomes (polysomes) de la lignée NIH: OVCAR-3, une lignée qui possède plusieurs transcrits de CA 125 (figure 17). L'extraction des polysomes permet

d'isoler les ARNm qui sont liés à plusieurs ribosomes. Cette extraction a été réalisée en arrêtant la traduction cellulaire avec la cycloheximide, un antibiotique qui fixe les ribosomes sur les ARNm. Ensuite, les lysats cellulaires ont migré sur deux gradients de sucrose 20-45%. Finalement, nous avons recueilli et dosé à 254nm des fractions qui provenaient des deux gradients de sucrose.

Le graphique de la densité optique des fractions des gradients de sucrose montre des pics qui semblent correspondre aux sous-unités des ribosomes (40S et 60S), aux monosomes et aux polysomes. Les pics des polysomes sont bien définis et couvrent une grande région dans les deux gradients de sucrose ce qui nous indique une bonne séparation. Les polysomes semblent se situer dans les fractions 24 à 55 pour les deux gradients de sucrose. L'isolement des ARN à partir des fractions des gradients de sucrose montre un patron d'ARN ribosomal (ARNr) qui corrèle avec le profil des polysomes. La sous-unité 40S est composée de l'ARNr 18S et la sous-unité 60S comprend l'ARNr 28S. Les monosomes ainsi que les polysomes possèdent les ARNr 18S et 28S (figure 19).

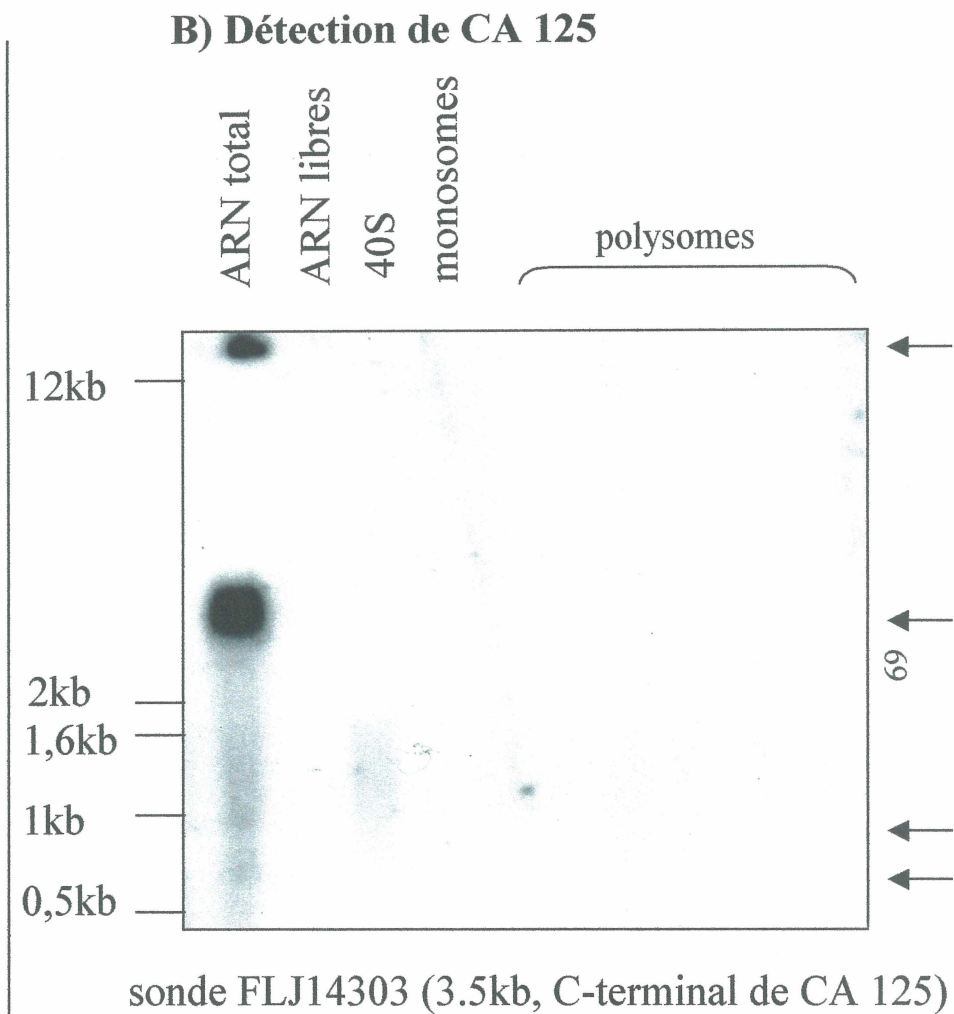
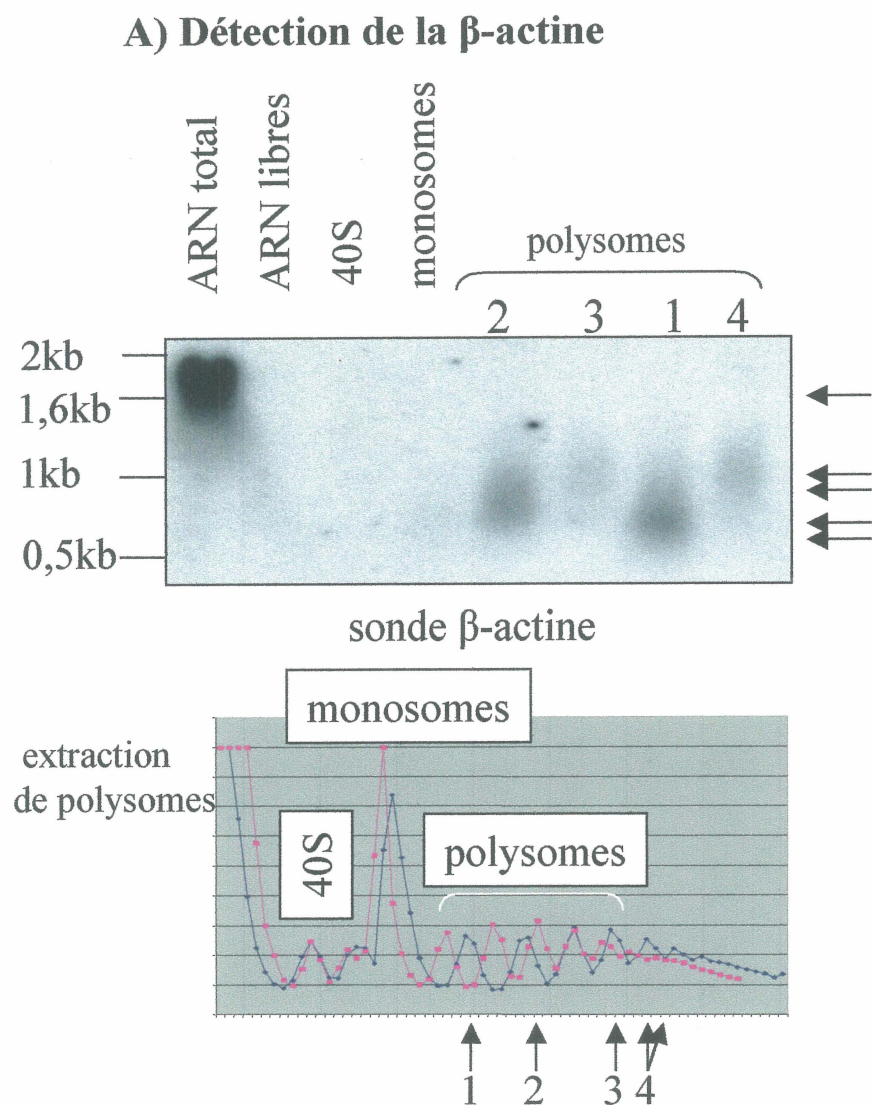
L'efficacité de l'extraction des polysomes a été déterminée par l'analyse Northern d'un transcrit très traduit, la  $\beta$ -actine. Les échantillons analysés contenaient environ 30 $\mu$ g d'ARN. L'analyse Northern indique une bande bien visible dans les fractions des polysomes. La taille de cette bande est, toutefois, plus basse que celle observée dans les ARN totaux de la lignée NIH: OVCAR-3 (contrôle positif) et augmente selon le





pourcentage de sucrose (figure 20). Les ARNm de la  $\beta$ -actine mesurent entre 0,5kb et 1kb, au lieu de 1,9kb. L'analyse Northern des ARNm de la  $\beta$ -actine a été réalisée à deux reprises avec des lysats cellulaires différents de la lignée NIH: OVCAR-3. Dans les deux cas, nous avons observé la présence d'une bande plus basse dans les fractions des polysomes et la taille de cette bande augmente avec l'augmentation du pourcentage de sucrose dans le gradient. Ainsi, l'extraction des polysomes est suffisamment efficace pour bien détecter les ARNm de la  $\beta$ -actine dans les fractions des polysomes, mais elle semble avoir affectée l'intégrité de ces ARNm.

L'analyse Northern des ARNm traduits de CA 125 montre aucun transcrit dans les fractions des polysomes (30 $\mu$ g ARN) avec la sonde FLJ14303 (3,5kb, C-terminal de CA 125). Nous avons, toutefois, détecté les transcrits de CA 125 dans les ARN totaux de la lignée NIH: OVCAR-3 (contrôle positif). Ainsi, les conditions utilisées pour détecter les ARNm traduits de CA 125 à partir de l'extractions des polysomes de la lignée NIH : OVCAR-3 ne nous a pas permis d'observer les transcrits traduits de CA 125.



**Figure 20:** A) Contrôle de l'efficacité de l'extraction des polysomes par l'analyse Northern de la  $\beta$ -actine, un ARNm fortement traduit. B) Analyse des transcrits traduits de CA 125 par l'analyse Northern. Les transcrits de la  $\beta$ -actine et de CA 125 ont été analysés dans différentes fractions de l'extraction de polysome de la lignée NIH:OVCAR-3 (ARN total, ARN libre, 40S, monosomes et polysomes). Chaque échantillon comprend environ 30 $\mu$ g d'ARN. Nous avons utilisés l'ARN total de la lignée NIH: OVCAR-3 comme contrôle positif.

## **IX. Discussion**

Le cancer ovarien est la cinquième cause de décès par cancer au Canada (McLaughlin et al., 2002). Si nous pouvions le diagnostiquer au premier stade de la maladie, il serait possible de le guérir simplement en procédant à l'ablation des ovaires. Ainsi, l'identification de marqueurs tumoraux au stade I diminuerait considérablement le taux de mortalité associé à ce cancer. Pour le moment, le marqueur tumoral le plus connu et le plus utilisé pour le cancer ovarien est CA 125. Ce marqueur permet de suivre la progression du cancer ovarien, mais n'est pas assez spécifique pour le diagnostic de ce cancer. CA 125 est un bon marqueur tumoral, car il est exprimé dans le sérum d'environ 85% des patientes atteintes du cancer ovarien de type épithélial, soit le type le plus fréquent et le plus mortel (Hoskins, 2000).

Le rôle de l'antigène CA 125 dans le cancer ovarien n'est malheureusement pas connu. Son rôle semble davantage associé avec la progression du cancer plutôt qu'à son initiation, car l'augmentation du niveau de l'antigène CA 125 dans le sérum corrèle généralement avec la progression du cancer ovarien de type épithélial. Toutefois, il ne faut surtout pas exclure la possibilité que l'antigène CA 125 puisse jouer un rôle très tôt dans le cancer ovarien de type épithélial et qu'il pourrait également être impliqué dans les autres types de cancer ovarien. Premièrement, il a été démontré que l'antigène CA 125

est exprimé à la surface de l'ovaire normal au niveau des kystes d'inclusion (Hoskins, 2000). Ces kystes d'inclusion dérivent des fissures irrégulières de l'épithélium de surface suite à l'ovulation. Le cancer ovarien de type épithélial semble survenir plus fréquemment au niveau des kystes d'inclusion (Cruet et al., 2000). La présence de l'antigène CA 125 au niveau des kystes d'inclusion, avant l'apparition de tumeur, peut laisser croire qu'il est impliqué tôt dans le cancer ovarien. Deuxièmement, il y a plusieurs évidences in vivo et in vitro qui suggèrent que CA 125 soit régulé par des hormones, des facteurs de croissances et l'AMP cyclique (De Los, 1993). Par exemple, les glucocorticoïdes ainsi que le facteur de croissance B (un peptide régulant le processus cellulaire au niveau de l'ovaire) entraînent une diminution de l'expression de CA 125 (De Los, 1993). Ainsi, nous pourrions imaginer qu'une dérégulation de l'expression de CA 125 au niveau des kystes d'inclusion pourrait favoriser l'apparition de tumeurs. Il est connu qu'à la surface de l'ovaire, les facteurs de croissances et les cytokines influencent localement la croissance et la différenciation cellulaire de l'épithélium de surface et peuvent conduire à des événements entraînant les changements néoplasiques (Bartlett, 2000).

Certains rôles pour l'antigène CA 125 ont été suggérés. Premièrement, il semble que l'antigène CA 125 puisse jouer un rôle dans la croissance et le développement, car il est exprimé au niveau des tissus fœtaux (épithélium cœlomique et amniotique) et au niveau du liquide amniotique, du lait maternel, du sérum maternel durant le premier

trimestre et du col utérin. D'autres évidences suggèrent un rôle de prévention de l'adhésion cellulaire (James et al., 1997). Ce rôle serait particulièrement important pour la prolifération cellulaire, une particularité de l'épithélium de surface de l'ovaire.

Nous sommes intéressés à étudier le rôle de CA 125 dans le développement du cancer ovarien. Jusqu'à tout récemment, la complexité à étudier CA 125 découlait du manque d'informations biochimiques et surtout génétiques. L'avancement du point vu génétique provient du clonage, en 2001, d'un excellent candidat de CA 125 par Yin et Lloyd. Ces derniers ont cloné un ADNc de 5,9kb qui est incomplet en 5'. Cette séquence est identique à une séquence qui avait été trouvée par le projet de séquençage du génome humain (HUGO). Cette séquence a été désignée *MUC16* par le comité de nomenclature des gènes et a été localisée sur le chromosome 19p13.3. Le séquençage génomique à cette position est incomplet et présente des segments non ordonnés (Yin et Lloyd, 2001). Ainsi, le séquençage du génome humain ne nous informe pas sur l'extrémité 5' manquante de *MUC16*.

### **Isolement des fragments d'ADNc de CA 125 par la technologie de Smart<sup>TM</sup>RACE**

Les ADNc complets de CA125 seraient un bon outil pour déterminer leurs rôles dans le cancer ovarien. Si le clone *MUC16* est une partie de CA 125, il suffit d'isoler l'extrémité manquante en 5'. Nous avons choisi la technologie de RACE en 5' afin

d'isoler cette extrémité. Cette technologie fait appel aux techniques de RT-PCR. Tout d'abord, la transcription inverse des ARNm a été réalisée avec l'enzyme PowerScript à partir d'un oligo dT modifié. Cette enzyme ajoute entre 3 et 5C à l'extrémité 5' des premiers brins d'ADNc. Ensuite, un oligo comprenant 3G en 3' a été hybridé aux niveaux de ces C. Finalement, l'amplification des fragments d'ADNc du gène d'intérêt a été réalisée à partir d'un mélange d'amorces en 5' qui est spécifique à l'oligo ajouté et d'une amorce en 3' qui est spécifique au gène d'intérêt (figure 7).

Avant de réaliser le RACE en 5', nous avons confirmé que le clone *MUC16* était une partie de CA 125, car Kenneth O. Lloyd ne l'avait pas démontré avec certitude (Yin et Lloyd, 2001). Plusieurs évidences le suggèrent, mais ne le confirment pas. Premièrement, la composition en acides aminées de protéine MUC16 est similaire à celle de l'antigène CA 125 purifié. Deuxièmement, la protéine MUC16 comprend des répétitions en tandem et plusieurs sites de O-glycosylations suggérant qu'il soit une mucine; comme il a été proposé précédemment pour CA 125. La protéine MUC16 semble aussi posséder un domaine transmembranaire et un site potentiel de phosphorylation. Il a, également, été démontré que l'antigène CA 125 se retrouve associé à la membrane plasmique de certaines cellules épithéliales et qu'il peut être phosphorylé. Finalement, des séquences peptidiques de CA 125 purifiées correspondent à des parties de la protéine MUC16 (Yin et Lloyd, 2001). Toutefois, Yin et Lloyd n'ont pas démontré que des anticorps contre l'antigène CA 125 reconnaissent le clone *MUC16* une fois exprimé dans les cellules eucaryotes.



N'ayant pas le clone *MUC16* à notre disposition, nous avons obtenu le clone de la protéine hypothétique FLJ14303 (séquence disponible dans GenBank au numéro AK024365). Ce clone ne possède pas les 6 premières répétitions en tandem de *MUC16*. Ainsi, il comprend 3 répétitions en tandem suivi du même domaine C-terminal que *MUC16* (figure 9). Nous avons transfecté le clone de la protéine hypothétique FLJ14303 dans la lignée COS-7, une lignée négative pour CA 125 par immunobuvardage et l'avons détecté par immunobuvardage à l'aide de deux anticorps monoclonaux spécifiques à CA 125, soit OC125 et VK-8. L'anticorps OC125 est utilisé cliniquement pour mesurer le niveau de CA 125 dans le sérum. Les anticorps ont permis de détecter une protéine d'environ 170KD lorsque la lignée COS-7 était transfectée de façon transitoire avec le clone FLJ14303 (figure 10). La taille attendue de la protéine, sans les modifications post-traductionnelles, est de 130KD. Le résultat d'immunobuvardage, nous confirme que le clone FLJ14303 est bel et bien reconnu par les anticorps OC125 et VK-8. Par la suite, Lloyd et al. ont également confirmé notre résultat (Lloyd et al., 2002). Les anticorps OC125 et VK-8 reconnaissent des épitopes différents sur CA 125. Il a été démontré que l'anticorps OC125 reconnaît un épitope peptidique situé dans chaque répétition en tandem (O'Brien et al., 2001). De plus, il est fortement suggéré que l'anticorps VK-8 reconnaisse aussi un épitope dans les répétitions en tandem (O'Brien et al., 1998). De cette façon, le clone *MUC16* serait également détecté par ces deux anticorps.

Avant de conclure hors de tout doute que *MUC16* est une partie de CA 125, il faut



considérer que les anticorps utilisés reconnaissent probablement la région répétée en tandem de *MUC16*. Il est connu que les anticorps des mucines donnent de nombreuses réactions croisées avec différentes apomucines (axe peptidique des mucines). Toutefois, les sondes nucléiques montrent une spécificité stricte (Porchet et al., 1999). Étant donné que la séquence de la région répétée en tandem de *MUC16* est distincte des autres mucines, nous devons exclure cette possibilité (Dekker et al., 2002). Ainsi, la détection de la protéine hypothétique FLJ14303 avec des anticorps spécifiques à CA 125 et la composition en acides aminés de *MUC16*, nous permettent de conclure que *MUC16* est une partie de CA 125.

En considérant la séquence nucléique de *MUC16* comme la région 3' de CA 125, le RACE 5' a été réalisé en utilisant une amorce spécifique à *MUC16*, afin d'amplifier l'extrémité manquante de CA 125. La transcription inverse a été effectuée à partir des ARN totaux des lignées NIH:OVCAR-3 et COS-7. La lignée NIH:OVCAR-3 a été utilisée précédemment pour l'isolement du clone *MUC16* (Lloyd et Yin, 2001), tandis que les ARN totaux de la lignée COS-7 ont été utilisés comme contrôle négatif, car nous ne détectons pas la protéine CA 125 par immunobuvardage.

Les produits de RACE 5' obtenus se situent entre 1 et 3,5kb avec les ARN de la lignée OVCAR-3 (RACE5'/OVCAR-3) et à 2,5kb pour les ARN de la lignée COS-7 (RACE 5'/COS-7) (figure 11). La bande à 2,5kb pour le RACE 5'/COS-7 n'est pas observée avec le RACE5'/OVCAR-3 suggérant que cette bande puisse être spécifique à

CA 125. En effet, nous ne pouvons pas exclure la possibilité d'avoir un ARN spécifique à CA 125 dans la lignée COS-7, même si la protéine CA 125 n'a pas été détectée par immunobuvardage. Il est connu que nous pouvons détecter les ARNm d'une protéine sans pour autant être en mesure de détecter la protéine. Plusieurs facteurs entre en ligne de compte, tels que la stabilité des ARNm d'intérêts et le niveau de traduction de la protéine.

En considérant que l'amorce spécifique à *MUC16* se situe à 2,5kb de l'extrémité 5' de ce clone, la longueur minimale attendue est de 2,5kb (figure 11). Il est possible que CA 125 possède différents transcrits, ce qui pourrait expliquer les bandes plus petites que 2,5kb. Ces bandes pourraient aussi être dues à une mauvaise efficacité du PCR. Nous avons isolé et cloné, dans le vecteur *pScreen-I-T-vector*, les bandes  $\geq$  à 2,5kb. Deux clones provenant du RACE 5'/COS-7 (#6 et 7) et six clones provenant du RACE 5'/OVCAR-3 (#5, 9, 11, 16, 17 et 25) ont été séquencés. Les clones #7 et 25 ont été séquencés au complet, tandis que les autres clones ont été séquencés qu'aux extrémités (figure 14). L'alignement de la séquence du *MUC16* avec les séquences de l'extrémité 5' des produits de RACE ([www.genebee.msu.su/services/malign\\_reduced.html](http://www.genebee.msu.su/services/malign_reduced.html) et [www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html)) révèle que les clones #5, 6, 7, 9, 11 semblent correspondre aux 6 premières répétition en tandem de *MUC16* (figures 14 et 15), tandis que les séquences en 5' des autres clones (#16, 17 et 25) semblent être des répétitions différentes, mais similaires à celles connues du clone *MUC16*. La séquence

en acides aminés des clones #5, 7 et 9 est identique à celle de MUC16, tandis que les clones #6 et 11 ont un et deux acides aminés de différents. Pour une même longueur de séquence, les clones # 16, 17 et 25 ont entre 13 et 18 acides aminés de différents par rapport au clone *MUC16* (figure 14 et 15). La séquence des clones nous indique que tous les clones sont spécifiques à CA 125 et qu'ils se situent dans la région répétée en tandem. Les clones #16, 17, 25 semble être des séquences inconnues de MUC16.

Afin d'évaluer la possibilité que les clones #16, 17 et 25 correspondent à l'extrémité 5' de CA 125, nous avons répété un RACE 5' en utilisant une amorce située à 300pb de l'extrémité 5' de ces produits de RACE 5' (figure 16). Une bande majeure à 300pb a été obtenue, mais nous observons aussi des bandes faibles entre 0,5 et 2,5kb (figure 16). Ces bandes n'ont pas été clonées et séquencées parce qu'elles étaient très faibles et parce que le patron des bandes semble varier d'une expérience à l'autre. Le choix d'une amorce spécifique à CA 125 est très difficile étant donné qu'elle se situe au niveau de la région répétée en tandem. Les répétitions sont très similaires, ainsi les amorces peuvent s'hybrider à différents endroits. Nous avons choisi les amorces en fonction de la séquence connue du clone *MUC16*, mais il est possible que cette amorce s'hybride au niveau de la séquence inconnue de MUC16 et génère différents fragments. De plus, il est possible que CA 125 possède différents transcrits. Ainsi, le deuxième RACE 5' ne nous a pas permis de confirmer que les clones 16, 17 et 25 sont à l'extrémité 5' de CA 125.

Les produits de RACE #16, 17 et 25 correspondent peut-être à l'extrémité d'un ou plusieurs des transcrits de CA 125. Par digestion enzymatique avec *SalI*, les clones #16 et 17 contiennent des séquences d'environ 2,5kb et le clone #25 contient une séquence d'environ 3kb. Ainsi, ces clones ajoutent entre 0 et 500pb en 5' du clone *MUC16*. L'analyse de ces séquences indique qu'ils possèdent au moins une séquence d'initiation de la traduction (ATG) dans le bon cadre de lecture et ont une grande ressemblance avec la séquence consensus d'initiation de la traduction chez les vertébrés, GCCA/GCCAUGG (Kosak, 1987) (tableau 1 et figure 14). Ces clones pourraient donc correspondre à l'extrémité 5' de CA 125, car ils possèdent au moins une séquence ATG pouvant être utilisée pour l'initiation de la traduction. Afin de confirmer notre hypothèse, nous pourrions vérifier si ces clones sont traduits dans des cellules eucaryotes en utilisant un vecteur ne contenant pas les éléments nécessaires à la traduction.

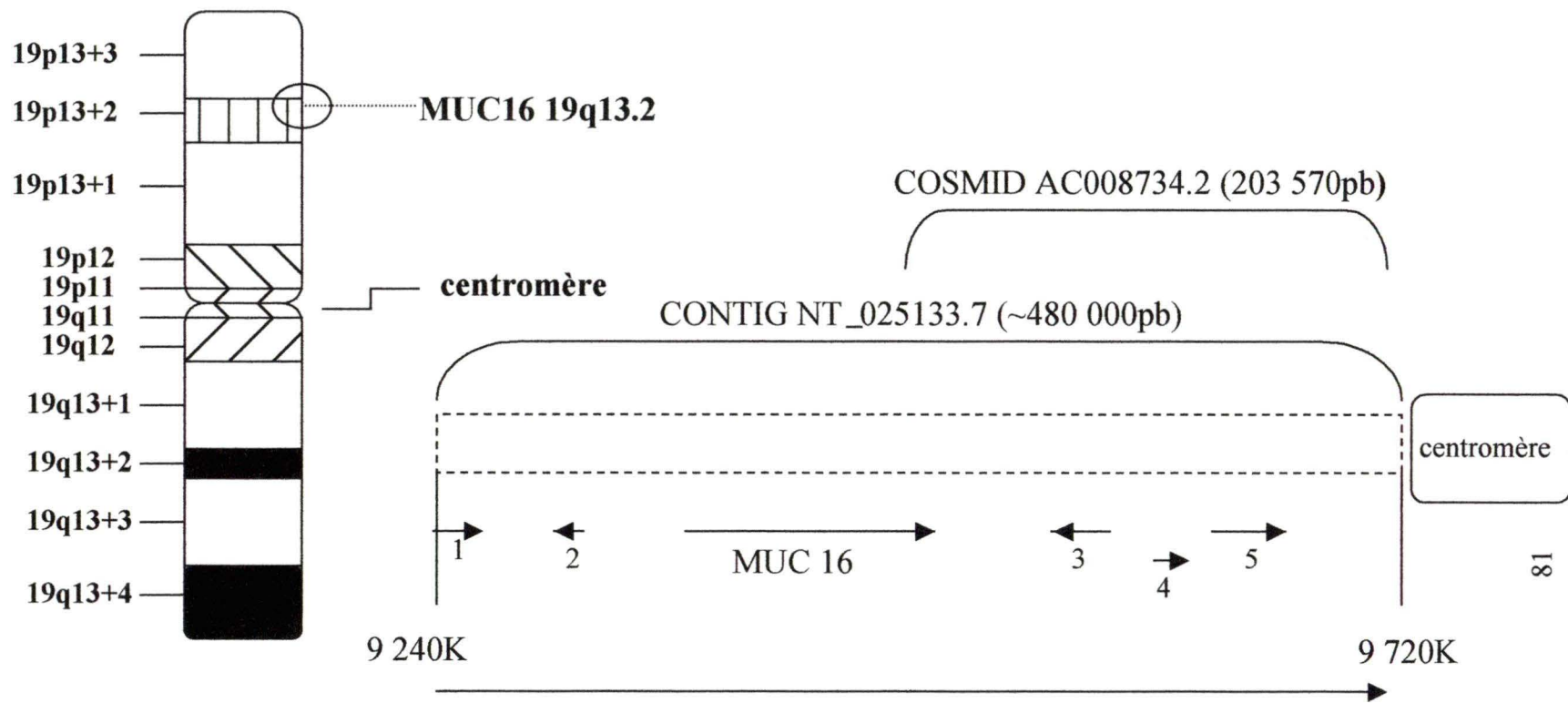
### **Détection des transcrits de CA 125**

L'analyse par Northern des ARN totaux de la lignée NIH:OVCA-3 avec la sonde FLJ14303 (3,5kb) montre au moins 8 transcrits se situant entre 1 et environ 35kb (figure 17). Les différents produits de RACE 5' avec les ARN totaux de cette lignée pourraient provenir de ces différents transcrits. De plus, il semble y avoir des transcrits >4,5kb suggérant que les produits de RACE5'/OVCA-3 #16, 17 et 25 puissent peut-être correspondre à l'extrémité 5' de CA 125. Concernant la lignée COS-7, nous observons

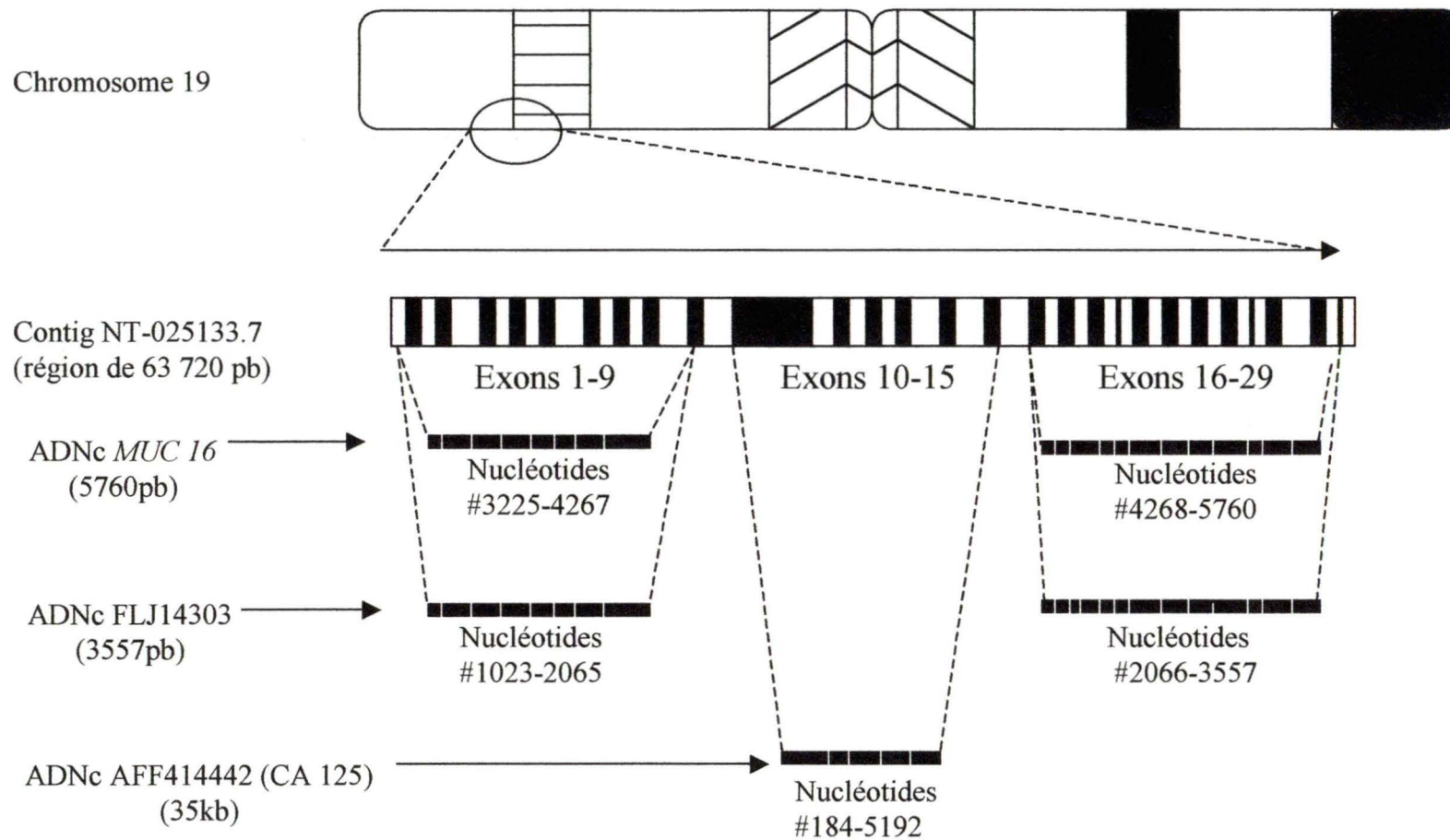
au moins quatre transcrits et ces transcrits sont observés à des intensités plus faibles que dans la lignée NIH:OVCAR-3 (figure 17). La différence dans le nombre et l'intensité des transcrits de CA 125 pourrait expliquer pourquoi lors du premier RACE5' nous avons obtenu quatre bandes pour la lignée NIH:OVCAR-3 et seulement une pour la lignée COS-7.

La présence de plusieurs transcrits pour CA 125 complique l'isolement des ADNc complets de CA 125. En 2001, une séquence complète de 35 kb (disponible sur GenBank au numéro AF414442) a été proposée par O'Brien (O'Brien et al., 2001). À première vue, l'existence d'un ADNc de cette taille semblait impossible. Toutefois, il a été démontré que la mucine MUC4 comprend 10 transcrits, dont un mesurant 26,5kb (Moniaux et al., 2000). De plus, l'analyse des transcrits de CA 125 par Northern montre de grands transcrits mesurant >12kb (figure 17). Il est donc possible que CA 125 possède un transcrit d'environ 35kb. Toutefois, la séquence O'Brien comporte certaines ambiguïtés. Premièrement, la région répétée en tandem posséderait plus de 60 répétitions. Ces répétitions ont été obtenues et alignées par PCR. O'Brien et al. mentionnent que l'ordre et le nombre de répétitions ne sont peut-être pas exacts. De plus, les PCR ont été réalisés à partir de l'ARNm d'un tissu d'ovaire cancéreux (O'Brien et al., 2001). Dans un tissu d'ovaire, contrairement à une lignée cellulaire, on retrouve plusieurs types cellulaires. Il est donc possible d'observer des différences dans le nombre de répétitions contenues dans la région répétée en tandem selon le type cellulaire et pour

une même cellule, tel est le cas pour MUC4 (Nollet et al., 1998). De cette façon, ils ont peut-être surévalué le nombre de répétitions en tandem. Deuxièmement, par homologie des séquences répétées en tandem avec les séquences génomiques, O'Brien a démontré que le cosmid AC008734.6 situé sur le chromosome 19q13,2 (sur le bras p) possède un contig (#32), ayant à son extrémité 3', les exons 1 et 2 des répétitions en tandem (figure 21). Chaque répétition isolée par O'Brien contiennent les mêmes cinq exons. Toutefois, l'alignement de la séquence complète (AFF414442, O'Brien) et partielle (*MUC16*) de CA125 avec la séquence génomique, montre que la portion N-Terminal du clone AFF414442 se situerait en plein centre de MUC16, c'est-à-dire aux exons 10-15 et non pas aux exons 1-5 (figure 22). Il est possible que cela soit relié au désordre retrouvé dans les séquences génomiques. Par contre, la séquence N-terminal (O'Brien) possède beaucoup de sites potentiels de O-glycosylations. Les séquences N-terminal des mucines sont reconnues pour être peu dense en sites potentiels de N- et O-glycosylations (O'Brien et al., 2001; Porchet et al., 1999). De plus, nous n'avons pas réussi à amplifier la portion N-terminal à partir des ARNm de la lignée NIH:OVCA-3, malgré plusieurs tentatives (résultat non montré). Finalement, même si cette séquence est belle et bien en N-terminal, cela ne signifie pas qu'elle soit en N-terminal de CA 125. Le lien entre la région répétée en tandem et le N-terminal n'a pas été démontré. Donc, nous mettons en doute le N-terminal et le nombre de répétitions en tandem de la séquence proposée par O'Brien (AFF414442).



**Figure 21: le mapping du gène MUC16 sur l'ADN génomique humain.** Le gène *MUC16* se situe sur le chromosome 19p au niveau du contig NT\_25133.7 (19q13.2). Ce contig comprend sept autres gènes similaires à MUC16 (1-5). Le chromosome 19 comprend également le cosmid AC008734.2 où nous retrouvons le N-terminal de CA125 proposé par O'Brien et al. Figure adaptée du site internet Genbank.

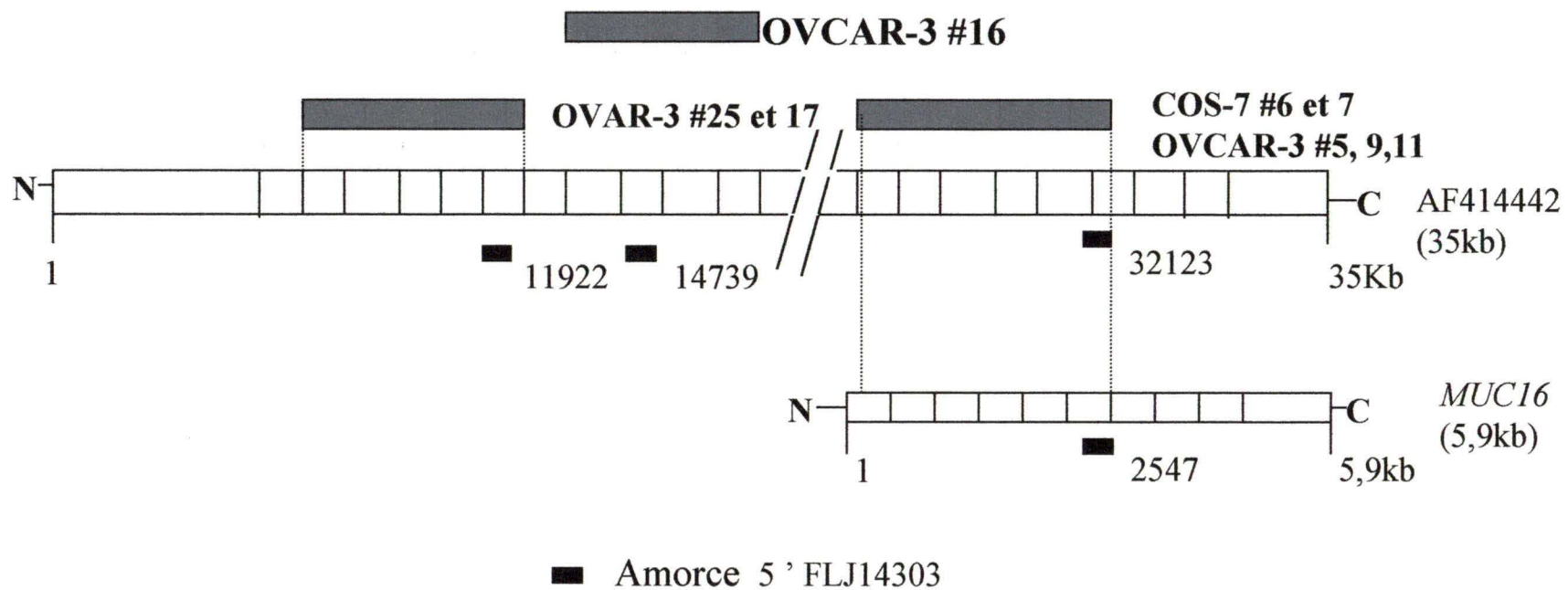


**Figure 22: Alignement des ADNc FLJ14303, MUC16 et AFF414442 avec l'ADN génomique humain (projet HUGO).** Certaines régions des ADNc *MUC16*, FLJ14303 et AFF414442 sont retrouvées dans la séquence génomique. Les nucléotides #3225 à 5760 de l'ADNc de *MUC16* ou les nucléotide #1023-3557 de l'ADNc FLJ14303 comprennent les exons 1-9 et 16-29 du contig NT-025133.7. Les nucléotides #184-5192 de l'ADNc AFF414442 comprennent les exons 10-15 du contig NT-025133.7. Les exons sont représentés par des rectangles noirs et les introns par des rectangles blancs au niveau du contig NT-025133.7. Les alignements ont été réalisés à l'aide du site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.



L'alignement des séquences 5' des produits RACE5'/OVCAR-3 #17 et 25 avec la séquence de O'Brien (AFF414442) illustre une forte homologie (98-99% d'identité). Les clones #17 et 25 se situent à environ 9kb de l'extrémité 5' de cette séquence, tandis que la séquence #16 se situe à environ 14kb de l'extrémité 5'. Tous les autres clones se situent à environ 30kb, c'est-à-dire au niveau de la première et deuxième répétition en tandem de *MUC16*. La séquence C-terminal de O'Brien correspond à la séquence de *MUC16*. L'amorce 3' utilisée pour le premier RACE 5' peut s'hybrider parfaitement aux positions 11 922, 14 739 et 32 123 dans la séquence de O'Brien (35kb) (figure 23). Ceci permet d'expliquer la position des clones #17 et 25, mais pas celle du clone #16. La séquence de O'Brien existe peut-être avec ou sans modifications puisque certains de nos produits de RACE ont une plus grande homologie avec cette séquence qu'avec celle de *MUC16*. Toutefois, étant donné que le clone #16 ne semble pas s'aligner parfaitement avec la séquence de O'Brien, cela suggère que la séquence de O'Brien ne soit pas tout à fait exact. Si nous considérons qu'il n'y a pas d'erreur de séquençage, nous pouvons conclure que les clones #16, 17 et 25 correspondent bel et bien à des séquences inconnues de *MUC16*.

Les séquences des clones #16, 17 et 25 pourraient correspondre à une partie manquante de *MUC16* ou d'un autre gène de la même famille. La séquence génomique sur le chromosome 19p13.2 indique cinq gènes homologues à *MUC16* (LOC 199749, LOC 199750, LOC 199751, LOC204834 et 199753). Certains de ces gènes sont orientés



**Figure 23: Alignement des séquences du premier RACE 5' avec la séquence proposée de O'Brien (AF414442).** Les clones #5, 6, 7, 9 et 11 se situent dans les deux premières répétitions de *MUC16* et ont une longueur d'environ 2,5kb. Les clones #16, 17 et 25 se situent dans une région inconnue de *MUC16* et mesure entre 2,5kb et 3kb. Ces séquences ont davantage d'homologie avec la séquence AF414442 que la séquence *MUC16*.

à l'inverse sur le brin opposé. La famille des mucines 11p15 contient quatre mucines homologues situées sur le chromosome 11p15, de cette façon il pourrait exister une famille des mucines CA 125.

Un autre ADNc complet de CA 125 pourrait être la protéine hypothétique FLJ14303. Un des ADNc de MUC4 ne contient pas de N-terminal ce qui suggère qu'il soit possible d'avoir des transcrits de CA 125 ne contenant pas de N-terminal (Moniaux et al., 2000). L'analyse Northern des ARN de CA 125 dans différentes lignées cellulaires (SKOV-3ip1, OV-4, HeLa, PA-1, OVCAR-3) semble montrer un transcrit autour de 3,5kb (figure 17). Le clone de la protéine hypothétique FLJ14303 pourrait être un ADNc complet de CA 125. Plusieurs observations permettent de le justifier. Premièrement, la transfection du clone FLJ14303 (pAdTrack/FLJ14303) dans la lignée NIH:OVCAR-3, nous indique que son transcrit migre au même endroit qu'un transcrit endogène de la lignée NIH:OVCAR-3 lorsque nous analysons les ARN totaux à l'aide de la sonde FLJ14303. En comparaison avec la  $\beta$ -actine, nous remarquons que l'intensité du transcrit à environ 3,5kb augmente lorsque la lignée NIH:OVCAR-3 est transfectée avec le clone FLJ14303 (figure 18, Nathalie Cloutier, stagiaire). De plus, le clone FLJ14303 a été isolé d'une librairie humaine d'ADNc construite avec la méthode d'*oligo-capping* (Gubler and Hoffman, 1983). Théoriquement, cette méthode permet d'isoler les ADNc complets en 5'. Finalement, le clone FLJ14303 contient en 5' une séquence ATG dans le bon cadre de lecture et pouvant être utilisée pour l'initiation de la traduction.

Les différents transcrits de CA 125 peuvent provenir entre autre du polymorphisme et de l'épissage alternatif. Le polymorphisme génétique est la présence de multiples allèles (variants d'un gène donné) à un locus génétique. Le locus génétique est l'emplacement exact d'un gène sur un chromosome. Chez l'humain le polymorphisme implique principalement des petites séquences répétées en tandem (Snustad et al., 1997). On observe énormément de polymorphisme au niveau des gènes des mucines. Lorsque leur domaine nucléique répété dépasse quelques kilobases, on voit apparaître un polymorphisme interindividuel de type VNTR dû à une instabilité du nombre de répétitions au cours des générations (Porchet et al., 1999). Étant donné la présence de longs transcrits pour CA 125, il est fort probable qu'il y a du polymorphisme. Par exemple, *MUC4* montre une variation dans la longueur de la région répétée en tandem. Il est suggéré qu'un nombre variable de répétition en tandem (VNTR) soit spécifique à chaque individu (Nollet et al., 1998). Cette région varie entre 7 et 19kb chez la population dans le Nord de la France. La variation du nombre de répétitions est également observée dans le gène *MUC1* où les allèles contiennent entre 20 et 125 répétitions en tandem (Gendler et al., 1990). Il a été rapporté que les individus avec un petit génotype (matériel génétique d'un individu) pour *MUC1* sont plus susceptibles de développer un carcinome gastrique, suggérant que les gènes des mucines avec la variabilité VNTR aient probablement une fonction importante (Carvalho et al, 1997). Dans un même ordre d'idées, la différence des transcrits que nous avons observée selon le type cellulaire

pourrait suggérer que certains transcrits soient importants pour le développement du carcinome ovarien. La comparaison des transcrits de CA 125 dans les cellules primaires humaines d'ovaire normal (OVN-T) avec ceux des lignées humaines d'ovaire cancéreux (OVCAR-3, SKOV-3 et SKOV-3ip1) montre un patron différent. Les transcrits >12kb observés dans les cellules OVCAR-3, SKOV-3 et SKOV-3ip1 sont peu ou pas détectés dans les cellules primaires (excepté les OVN-44). Il est à noter que les cellules OVN-44T se distinguent des autres OVN-T par leur morphologie et leur croissance. Elles ressemblent davantage à des cellules cancéreuses ce qui pourrait expliquer que le patron de ses transcrits ressemble davantage à celui des cellules cancéreuses (figure 17). Le domaine répété des gènes *MUC* (domaine PTS) présentent aussi du polymorphisme de mutations qui peut être mis en évidence par des techniques de Southern blot (Porchet et al., 1999). Ceci pourrait expliquer les différences retrouvées entre chaque répétition pour la région répétée en tandem de *MUC16* et de CA 125 (AFF414442; O'Brien). Les répétitions sont très similaires, mais distinctes. On retrouve quelques répétitions identiques dans la séquence CA 125 O'Brien (AFF414442). Finalement, certains transcrits de CA 125 pourraient provenir du polymorphisme allélique. Les cellules somatiques possèdent au moins deux allèles et donc deux copies d'un même gène. Il est possible qu'un même gène diffère selon l'allèle, comme il a été observé pour *MUC4* (Nollet et al., 1998)

Les différents transcrits de CA 125 pourraient également provenir de l'épissage

alternatif. L'épissage est le processus qui joint les exons de façon covalente et élimine les introns lors de la maturation de l'ARN. Les gènes eucaryotes incluent des régions 5' et 3' non codantes qui influencent la régulation de l'épissage ainsi que la transcription et la traduction des gènes (séquences non codantes). À partir d'un même gène, différents isoformes de la protéine peuvent être générés avec des voies alternatives de l'épissage d'exons. Les voies de l'épissage alternatif sont souvent spécifiques au tissu (Snustad et al., 1997).

L'épissage alternatif a été observé aussi chez différentes mucines, comme MUC1 et MUC4. Le gène de *MUC1* génère deux isoformes par épissage alternatif, MUC1/SEC (forme sécrétée) et MUC1/Y (forme liée à membrane qui manque les répétitions en tandem). Pour sa part, *MUC4* génère plusieurs isoformes par épissage alternatif, un associé à la membrane (sv8-MUC4), une famille sécrétée (sv1-sv7-MUC4) et deux sans répétitions en tandem (MUC4/X et MUC4/Y). Les sites d'épissages ont été démontrés (Moniaux et al., 2000). Les ARNm de CA 125 pourraient également être épissés alternativement. En fait, l'alignement des produits de RACE #16, 17 et 25 par rapport à la séquence de CA 125 O'Brien (35kb) montre qu'ils sont situés autour de 9kb et 14kb de l'extrémité 5'. Si l'ADNc de 35kb existe et que ces produits de RACE se situent réellement sur ce transcrit, il paraît improbable d'avoir obtenu ces résultats de RACE sans épissage alternatif. Le RACE fait appel à la transcription inverse réalisée

avec l'enzyme PowerScript. Cette enzyme peut synthétiser jusqu'à 9kb d'ADN. De cette façon, elle ne peut théoriquement pas aller plus loin que 24kb par rapport à l'extrémité 5' de l'ADNc de 35kb (figure 23). Évidemment, les séquences des clones #16, 17 et 25 pourraient correspondre à d'autres ADNc de CA 125 qui sont différents de *MUC16* et qui découlent ou non de l'épissage alternatif.

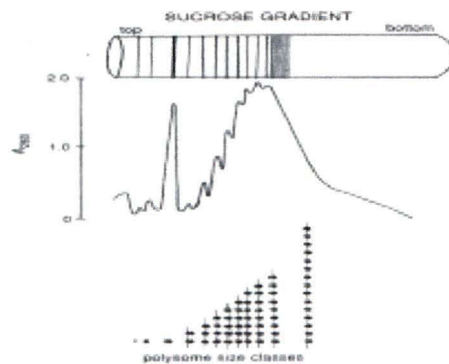
### **Détection des ARNm traduits de CA 125**

L'analyse Northern des transcrits de CA 125 ne nous informe pas sur ses transcrits traduits (figure 17). Puisque nous voulions isoler les ADNc de CA 125, il était important et justifié de déterminer les transcrits traduits de CA 125. Pour ce faire, nous avons tenté d'isoler les ARNm traduits de la lignée NIH:OVCAR-3 en effectuant une extraction de polysomes (polyribosomes). La lignée NIH:OVCAR-3 a été sélectionnée, car elle exprime un grand nombre de transcrits de CA 125 (figure 17).

L'extraction des polysomes a permis de purifier les polysomes sur deux gradients de sucrose et ensuite les ARNm traduits (figure 19). L'efficacité de l'extraction des polysomes a été déterminée par l'analyse Northern en regardant le niveau de la  $\beta$ -actine, un ARNm très traduit. L'analyse Northern de la  $\beta$ -actine dans différentes fractions des deux gradients de sucrose nous indique une bande dans les fractions des polysomes. La taille de cette bande (0,5-1kb) est, toutefois, plus basse que celle observée dans les ARN totaux de la lignée NIH:OVCAR-3 (1,9kb) et elle augmente dans les gradients de

sucrose. La taille attendue pour les ARNm de la  $\beta$ -actine était de 1,9kb, telle qu'observée dans les ARN totaux de la lignée NIH:OVCAR-3. L'analyse Northern des ARNm de la  $\beta$ -actine a été réalisée à deux reprises à partir de lysats cellulaires différents. Dans les deux cas, nous avons observé la présence d'une bande plus basse dans les fractions des polysomes et la taille de cette bande augmente avec l'augmentation du pourcentage de sucrose dans les gradients. Ainsi, cette bande spécifique à la  $\beta$ -actine pourrait résulter d'un clivage des ARNm de la  $\beta$ -actine. En effet, il est possible que des coupures dans les ARNm de la  $\beta$ -actine soient survenues en autres en raison des tensions occasionnées par les ribosomes ou de la RNase (ribonucléase). La RNase est une enzyme qui dégrade l'ARN. L'activité initiale de la RNase entraîne la conversion des polysomes longs en polysomes courts et son activité prolongée amène une accumulation des monosomes (Davies et Larkins, 1974). La majorité des protocoles d'isolement des polysomes préviennent faiblement l'action de la RNase (Davies et Abe, 1995). Dans notre profil de polysomes, nous avons justement observé une accumulation des monosomes qui semble provenir au détriment des polysomes. Nous avons obtenu une densité optique (D.O.254) d'environ 3.0 pour le pic de monosomes et une densité d'environ 1.5 pour chaque pic de polysomes (figure 19). Théoriquement, le profil de polysomes devrait montrer des pics de polysomes qui ont une hauteur semblable au pic de monosomes (Davies et Abe, 1995) (figure 24). Ainsi, il est fort possible que l'accumulation des monosomes provienne de la coupure des ARNm des polysomes.





**Figure 24 : profil des polysomes (tiré de Davies et Abe, 1995)**

Les coupures observées aux niveaux des ARNm de la  $\beta$ -actine semblent localisées à des endroits précis puisque nous avons obtenu, par l'analyse Northern, des bandes bien définies et non des traînées. Nous pensons que ces coupures se produisent entre les ribosomes. En effet, la liaison des ribosomes pourrait protéger certaines régions des ARNm contre la RNase ou pourraient créer des tensions qui occasionnent des coupures entre les ribosomes. L'analyse sur gel d'agarose des ARN provenant des fractions des polysomes ne montre, toutefois, pas de dégradation. Nous avons observé deux bandes qui correspondent aux ARNr 28S et 18S, et une traînée qui est caractéristique des ARNm cellulaires (figure 19). Les ARNr sont retrouvés principalement dans les ribosomes eucaryotiques, un complexe moléculaire composé de 4 molécules d'ARN et de 82 protéines ribosomales différentes. Ces ARNr sont probablement moins accessibles à la

RNase que les ARNm et ils ne sont probablement pas sujet à des tensions, ce qui pourrait expliquer leur migration à la taille prédite. Par contre, la présence d'une traînée caractéristique des ARNm ne nous permet pas d'exclure la possibilité que certains ARNm aient été coupés. Les coupures observées dans les ARNm traduits de la  $\beta$ -actine pourraient être associées à la RNase ou aux tensions occasionnées par la présence des ribosomes sur les ARNm.

L'analyse Northern des ARNm de CA 125 ne montre aucun transcrit dans les fractions des polysomes avec la sonde FLJ14303 (3.5kb, C-terminal de CA 125). Nous avons, toutefois, détecté les transcrits de CA 125 dans les ARN totaux de la lignée NIH: OVCAR-3 (contrôle positif) (figure 20). Le patron de bande de la lignée NIH : OVCAR-3 diffère de celui de la figure 17. La migration du gel ainsi que l'intégrité des ARNm de CA 125 influencent la détection de ces transcrits. Nous avons fait migrer moins longtemps le gel pour l'analyse Northern, ce qui nous a permis de détecter le transcrit habituellement caché par les ARNr 28S. Lorsque nous utilisons exactement les mêmes conditions, le résultat est reproductible (n=3). Malheureusement, les conditions utilisées ne nous ont pas permis d'observer les transcrits traduits de CA 125 dans 30 $\mu$ g d'ARNm.

Différentes hypothèses peuvent être envisagées pour expliquer la non détection des transcrits traduits de CA 125 dans la lignée NIH: OVCAR-3. Premièrement, l'extraction des polysomes pourrait ne pas avoir été assez efficace pour détecter ces transcrits qui sont fort probablement moins traduit que la  $\beta$ -actine. Comme aucune étude

décrivant la traduction des ARNm de CA 125 n'a encore été publiée, nous ne pouvions pas prévoir l'efficacité de la traduction de ces ARNm. Deuxièmement, le choix de la sonde utilisée pour détecter les transcrits traduits de CA 125 n'était peut-être pas approprié. La sonde FLJ1403 est très longue, elle mesure 3,5kb. Il est connu que l'utilisation d'une longue sonde diminue les probabilités de détecter les transcrits coupés. La sonde utilisée pour détecter les ARNm traduits de la  $\beta$ -actine mesurait seulement 29pb ce qui augmentait évidemment la probabilité de détecter ces ARNm, même s'ils étaient coupés. Troisièmement, les ARNm des mucines épithéliales sont connus pour être très instables (Van Klinken et al., 1995). L'isolement des transcrits intacts des mucines épithéliales est par conséquent très difficile. Ainsi, il est très probable que les ARNm traduits de CA 125, une protéine similaire aux mucines épithéliales, seraient instables, coupés et/ou dégradés.

Cependant, certaines expériences pourraient être tentées afin de confirmer la non détection des transcrits traduits de CA 125. Dans un premier temps, nous pourrions réaliser un RT-PCR dans les fractions des polysomes pour s'assurer de la présence des ARNm traduits de CA 125. Il faudrait, toutefois, prendre en considération que ces ARNm peuvent être coupés ou dégradés. Dans un deuxième temps, nous pourrions utiliser d'autres sondes pour l'analyse Northern, par exemple certaines sondes sont plus courtes. Finalement, dans un troisième temps nous pourrions regarder un autre ARNm reconnu comme étant très traduit et vérifier s'il est également coupé et ou dégradé.

En conclusion, les conditions utilisées pour l'isolation des polysomes et l'analyse Northern des ARNm traduits de CA 125 n'étaient pas adéquates pour déterminer les ARNm utilisés de CA 125. En effet, il est fort à parier que les tensions exercées par la liaison des ribosomes aux ARNm et/ou l'activité de la RNase, ainsi que l'instabilité reconnue des ARNm des mucines épithéliales seraient à l'origine du manque de succès dans la détection des ARNm traduits de CA 125.

La détermination des transcrits traduits de CA 125 par Northern blot, nous informerait sur le nombre d'ADNc à isoler ainsi que sur leurs longueurs. La technologie de RACE ne semble pas appropriée pour isoler ces ADNc, car il est fort probable d'avoir des transcrits avec un nombre variable de répétitions en tandem et ayant subi de l'épissage alternatif. Ainsi, avec la technologie de RACE, nous risquons de construire un ADNc qui n'existe pas. Il faut donc penser à des approches qui permettent d'isoler les ADNc sans entraîner de modifications. Par exemple, nous pourrions cribler une librairie d'ADNc chez *E. coli* à l'aide de différentes sondes. Il serait important d'utiliser une librairie qui favorise l'isolement des ADNc complets. De plus, il serait préférable de choisir des sondes autant dans la région répétée en tandem qu'au niveau du C-terminal afin de repêcher autant les clones avec ou sans répétitions en tandem. Si les transcripts de CA 125 étaient plus grand que 9kb, ce serait problématique dû à l'efficacité de la transcriptase inverse. Pour l'isolation de ces transcrits, il faudrait alors penser à une approche ne nécessitant pas l'utilisation des techniques de RT-PCR.

Afin de bien étudier les rôles de CA 125 dans le cancer ovarien, il est important de considérer que la protéine peut varier selon la source. De fait, CA 125 est exprimé dans les tissus fœtaux normaux, adultes normaux, adultes bénins et malins. Il n'est malheureusement pas connu si la structure de CA 125 est identique dans les différentes sources de tissus (James, 1997). Il serait possible que CA 125 joue un rôle différent selon sa source à l'aide de différents isoformes. En outre, nous avons observé des différences dans le patron des transcrits entre les cellules d'ovaires normaux et cancéreux (figure 17). Ainsi, certains isoformes de CA 125 pourraient être importants dans le cancer ovarien et d'autre pas. Il est donc essentiel d'isoler tous les ADNc complets traduits de CA 125, afin d'étudier leurs rôles dans le développement du cancer ovarien. La distinction des différents isoformes, si bien sûr CA 125 possède plusieurs isoformes, pourrait également être utile pour le diagnostique du cancer ovarien.

## V. Conclusion

L'antigène tumoral CA 125 pourrait être important dans l'initiation et ou la progression du cancer ovarien de type épithélial. Toutefois, l'implication de l'antigène CA 125 dans le cancer ovarien n'est pas connue dû principalement au manque d'informations génétiques. Notre étude a permis de suggérer fortement le clone *MUC16* (Yin et Lloyd, 2001) comme une partie de l'ADNc de CA 125. La séquence de *MUC16* nous a permis, par la suite, d'obtenir à l'aide de la technologie de RACE (Clontech) huit portions de séquences (entre 2,5kb et 3kb). L'alignement de ces séquences avec le clone *MUC16* (5,9kb) et le clone CA 125 O'Brien (AFF41442, 35kb) indique que les clones #5, 6, 7, 9 et 11 correspondent à une partie de *MUC16*, tandis que les clones 16, 17 et 25 ont davantage d'homologie avec la séquence du clone AFF414442, la séquence complète de CA 125 suggérée par O'Brien (O'Brien et al., 2001).

La séquence de CA 125 proposée par O'Brien (AFF414442, 35kb) n'a pas été confirmée et n'est pas complètement en accord avec la structure du gène proposé par le projet HUGO. Toutefois, l'analyse Northern a montré des transcrits de CA 125 pouvant mesurer plus de 12kb suggérant que cet ADNc puisse exister. Cette analyse par Northern, nous a indiquée au moins huit transcrits de CA 125. Ceux-ci se situent entre 1 et environ 35kb. Certaines séquences de RACE (#16,17 et 25) pourraient correspondre à l'extrémité 5' d'un ou plusieurs de ces transcrits étant donné que ces séquences sont différentes du clone *MUC16* et qu'elles possèdent une séquence ATG dans le consensus

de la boîte Kosak. De plus, le clone FLJ14303 (GenBank) pourrait correspondre aussi à un ADNc complet de CA 125, car nous avons observé un transcrit endogène de la même taille que ce clone dans la lignée NIH:OVCAR-3.

L'analyse Northern a montré, également, un patron de transcrits de CA 125 différents entre les cellules primaires d'ovaire normal (OVN-T) et les lignées de cellules d'ovaire cancéreux de type épithélial (OVCAR-3, SKOV-3ip1 et SKOV-3). Cela pourrait suggérer que certains de ces transcrits puissent être important dans le cancer ovarien de type épithélial.

Finalement, les conditions utilisées pour l'isolation des ARNm traduits de la lignée NIH:OVCAR-3 n'étaient pas adéquates pour déterminer les ARNm traduits de CA 125. En effet, il y a fort à parier que l'instabilité reconnue des ARNm des mucines épithéliales ainsi que les tensions exercées par la liaison des ribosomes aux ARNm et/ou l'activité de la RNase seraient à l'origine du manque de succès dans la détection des ARNm traduits de CA 125.

Afin de déterminer l'implication de l'antigène CA125 dans le cancer ovarien de type épithélial, nous devons dans le futur isoler et caractériser tous les ADNc traduits de cette protéine.

## REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à mes directeurs de recherche, Claudine Rancourt, Ph.D., Raymund Wellinger, Ph.D., et Alain Piché, M.D., pour leur importante contribution à ma formation scientifique.

Je profite aussi de l'occasion pour remercier les membres du laboratoire et du département pour leur soutien, leurs idées et leur amitié.

J'aimerais, également, remercier Joseph Weber, Ph.D., et Jean-Luc Parent, Ph.D., pour l'évaluation de ce mémoire.



## **Bibliographie**

Andrianifahababa M., Moniaux N., Schmied B.M., Ringel J., Friess H., Hollingsworth M.A., Büchler M.W., Aubert J-P., and Batra S.K. (2001) Mucin (MUC) gene expression in human pancreatic adenocarcinoma and chronic pancreatitis: a potential role of MUC4 as a tumor marker of diagnostic significance. Clin. Cancer Res. 7: 4033-4040

Bartlett J.M.S. (2000) Ovarien cancer methods and protocols, Humana Press totowa, New Jersey, 817 pages

Bast R.C., Feeney M., Lazarus H., Nadler L.M., Colvin R.C., and Knapp R.C. (1981) Reactivity of a monoclonal antibody with human ovarian carcinoma. J. Clin. Invest. 68 :1331-1337

Boente M.P. (1996) Early ovarian cancer : a review of it's genetic and biologic factors detection and treatment. Curr. Probl. cancer XX(2)

Carreiras F., Cruet S., Staedel C., Sichel F., and Gauduchon P. (1999) Humain ovarian adenocarcinoma cells synthesize vitronectine and use it to organize their adhesion. Gynecol. Onco. 72:312-22

Carvalho F., Sruca R., David L., Amorim A., Seixas M., Bennett E.C, Clausen H., and Sabrinho-Simoes M. (1997) MUC1 gene polymorphism and gastric cancer an epidemiological study. *Gynecol. J.* 14:107-111

Cruet S., Carreiras F., Staedel C., and Gauduchon P. (1999) Molécules d'adhérence et protéases dans les cancers épithéliaux de l'ovaire. *Médecine/Sci.* 15:645-654

Davies E. and Abe S. (1995) Methods for isolation and analysis of polyribosomes. *Methods in cell Biology.* 50:209-22

Davies E. and Larkins BA(1974) Polyribosome degradation as a sensitive assay for endolytic messenger ribonuclease activity. *Anal. Biochem.* 61(1):155-164

Dekker J., Rossen J.W.A, Büller H.A., and Einerhand A.W.C. (2002) The MUC family : an obituary. *Trends Biochem. Sci.* 27(3):126-131

De Los Frailes M.T., Stark S., Jaeger W., Hoerauf A., and Wild L. (1993) Purification and characterization of the CA125 tumor-associated antigen from human ascites. *Tumor Biol.* 14:18-29

Dennis J.W., Granovsky M. and Warren C.E. (1999) Glycoprotein glycosylation and cancer progression. *Biochim. et Biophys. Acta* 1473 :21-34

Feldman G.B. and Knapp R.C. (1974) Lymphatic drainage of the peritoneal cavity and its significance in ovarian cancer. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 119(7) :991-994

Gardner M.J., Jones L.M.H., Catterall J.B., and Turner G.A. (1995) Expression of cell adhesion molecules on ovarian tumour cell lines and mesothelial cells, in relation to ovarian cancer metastasis. *Cancer Letters* 91:229-234

Gendler S.J., Lancaster C.A., Taylor Papadimitiou J., Duhig T., Peat N., Burchell J., Pemberton, Lalanl L.E.N., and Wilson D. (1990) Molecular cloning and expression of a human tumor-associated polymorphic epithelial mucin. *J. Biol. Chem.* 265:15286-15293

Giuntoli II R.L., Rodriguez G.C., Whitaker R.S., Dodge R., and Voynow J.A. (1998) Mucin gene expression in ovarian cancers. *Cancer Res.* 58:5546-5550

Hamilton T.C., Young R.C., Louie K.G., Behrens B.C., McKoy W.M., Grotsinger K.R., and Ozols R.F. (1984) Characterization of a xenograft model of human ovarian carcinoma which produces ascites and intraabdominal carcinomatosis in mice. *Cancer Res.* 44:5286-5290

Hoskins W.J., Perez C.A., and Young R.C. (2000) Principles and practice of gynecologic oncology 3<sup>e</sup> edition, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA, 1239 pages

James L.F., Konishi I., Geary S.M., Parmley T.H., Quirk J.G., and O'Brien T.J. (1997) CA125 phosphorylation is associated with its secretion from the WIHS human amnion cell line, *Tumor Biol.*, 18:278-289

Kozak M. (1987) An analysis of 5'-non coding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucl. Acids Res.* 15(20):8125-8132

Laurendeau G., and Marieb E.N. (1993) *Anatomie et physiologie humaines*, ERPI, St-Laurent, Canada, 1014 pages

Lloyd K.O., Yin B.W.T., and Kudryashov V. (1997) Isolation and characterization of ovarian cancer antigen CA125 using a new monoclonal antibody (VK-8) : identification as a mucin-type molecule. *Int. J. Cancer* 71:842-850

McLaughlin J.R., Dryer D., Mao Y., Morrison H., Schacter B., Villeneuve G., and Whyllie B. (2002) Cancer de l'ovaire, *Encyclopédie canadienne du cancer (ECC™)*. Statistiques canadiennes sur le cancer, 21 pages

Menon U. and Jacobs I. (2002) Screening for ovarian cancer. *Best Practice & Res. Clin. Obstet. and Gynecol.* 16 (4) :469-482

Merajver S.D., Pham T.M., Caduff R.F. (1995) Somatic mutations in the BRCA1 gene in sporadic ovarian tumors. *Nat. Genet.* 9 :439

Moniaux N., Escande F., Batra S.K., Porchet N., Laine A., and Aubert J-P (2000) Alternative splicing generates a family of putative secreted and membrane-associate MUC4 mucins. *Eur. J. Biochem.* 267 :4536-4544

Nollet S., Moniaux N., Maury J., Petitprez D., Degand P., Laine A., Porchet N., and Aubert J-P. (1998) Human mucin gene MUC4 : organization of its 5'-région and polymorphism of its central tandem repeat array. *Biochem.* 132 :739-748

O'Brien T.J., Beard J.B., Underwood L.J., Dennis R.A., Santin A.D. and York L. (2001) The CA125 gene: an extracellular superstructure dominated by repeat sequences. *Tumor Biol.* 22:348-366

Piver M.S., Mettlin C., DiCioccio R.A., Allen H.J., Sandecki A., Tsukada Y., Natarajan N., Wittemore A., and Ponder B. (1996-97) Familial ovarian cancer registry Newsletter

Porchet N., Buisine M-P., Desseyn J-L., Moniaux N., Nollet S., Degand P., Pigny P., Seuningen I.V., Laine A., and Auber J-P. (1999) Gènes MUC:une superfamille de gènes? Vers une classification fonctionnelle des apomucines humaines. *J. Soc. Biol.* 193(1):85-99.

Stevens A. and Lowe J. (1997) *Histologie humaine*, Paris, Bruxelles, 408 pages

Snustad P.D., Simmons M.J., and Jenkins J.B. (1997) *Principles of genetics*, John Wiley & Sons, Toronto, 829 pages

Taylor-Papadimitriou J., Burchell J., Miles D.W., and Dalziel M. (1999) MUC1 and cancer. *Biochim. and Biophys. Acta* 1455 :301-313

Tong X.W. and Kieback D.G. (1999) Molecular aspects of ovarian cancer. *Curr. Therapeutic issues in gynecol.* 13(1):109-133

Van Klíken B. J-W, Dekker J., Büller H. A., and Einerhand A. W. C. (1995) Mucin gene structure and expression: protection vs. adhesion. *Am. J. Physiol.* 269 (32):G613-G627

Yin B.W.T., Dinistrian A., and Lloyd K.O. (2002) Ovarian cancer antigen CA125 is encoded by the MUC16 mucin gene. *Int. J. Cancer* 98:737-740

Yin B.W.T. and Lloyd K.O. (2001) Molecular cloning of the CA125 ovarian cancer antigen : indentification as a new mucine (MUC16). *J. Biol. Chem.* 276 (29):27371-27375

Yousef G.M ., Kyriakopoulou L.G., Scorilas A., Fracchioli S., Ghiringhello B., Sarghooni M., Chang A., Damandis M., Giardina G., Hartwick W.J., Richiardi G., Massobrio M., Diamandis E.P., and Katsaros D. (2001) Quantitative expression of the human kallikrein gene 9 (KLK9) in ovarian cancer :a new independent and favorable prognostic marker. *Cancer Res.* 61:7811-7818